

Aus der Fachrichtung 2.4, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **TRPM3-Kanäle sind ionotrope Steroid- rezeptoren endokriner Zellen**

## **TRPM3 channels are ionotropic steroid receptors in endocrine cells**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissen-  
schaften*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2009**

vorgelegt von: **Thomas Friedrich Johannes Wagner**

geb. am: **21.02.1978 in Saarbrücken**

Homburg, März 2009

## Zusammenfassung

Diese Arbeit umfasst die bisher weitestgehende Charakterisierung von TRPM3-Kanälen. Sie reicht von der Identifizierung spezifischer Agonisten des Kanals über den funktionellen Nachweis endogener TRPM3-Kanäle in primären Zellen bis hin zur Aufklärung möglicher physiologischer Funktionen. Wir zeigen, dass TRPM3-Kanäle durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin und damit durch zwei chemisch völlig unterschiedliche Substanzen aktiviert werden können. Dabei ist Pregnenolonsulfat besonders interessant, da dieses Neurosteroid endogen im Körper von Säugetieren gebildet wird. Mit Hilfe dieser pharmakologischen Werkzeuge waren wir in der Lage, endogen exprimierte TRPM3-Kanäle funktionell nachzuweisen. Dieser funktionelle Nachweis ist hocheffizient und schneller als molekularbiologische Untersuchungen. Wir identifizierten auf diese Art und Weise endogene TRPM3-Kanäle in Hypophysenzellen und pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Durch den Nachweis von TRPM3-Kanälen in diesen hochspezialisierten Zellen stehen wir nun vor der Herausforderung, die Funktion, die TRPM3-Kanäle in diesen Zellen erfüllen, aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir uns bereits einigen der wichtigsten Funktionen der Zellen, in denen wir TRPM3 nachweisen konnten, gewidmet. So wird die Insulinsekretion von pankreatischen Inseln durch Pregnenolonsulfat über die Aktivierung von TRPM3 verstärkt. Inwieweit dieser Effekt von physiologischer Bedeutung ist, konnten wir jedoch nicht aufklären. Bisher wurde Pregnenolonsulfat nicht in den hohen Konzentrationen, die notwendig sind, um über die Aktivierung von TRPM3-Kanälen zu einer verstärkten Insulinsekretion zu führen, im Plasma von Säugetieren nachgewiesen. Interessant in diesem Zusammenhang ist aber mit Sicherheit die mögliche Verwendung von TRPM3 als Angriffspunkt zukünftiger Arzneimittel. Einen oral verfügbaren und potenten Agonisten von TRPM3 zu identifizieren, der die Insulinausschüttung verstärkt, wäre ein möglicher Ansatzpunkt zur Behandlung von Diabetes.

Ebenfalls untersucht haben wir eine mögliche Rolle von TRPM3-Kanälen als Aufnahmeweg von Zink pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Die Aufnahme von Zink ist speziell für die  $\beta$ -Zellen von elementar wichtiger Bedeutung, da sie während der

Sekretion des Insulins große Mengen von Zink verlieren, welches für die Prozessierung und Verpackung des Insulins von großer Bedeutung ist. Daher muss es permanent von den Zellen aufgenommen werden, wobei über diesen Prozess bisher sehr wenig bekannt ist. Neben diversen Zinktransportern spielen spannungsabhängige Kalziumkanäle eine wichtige Rolle bei der Zinkaufnahme pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Wir zeigten, dass durch TRPM3 signifikante Mengen von Zink in die  $\beta$ -Zelle gelangen können. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob TRPM3-Kanäle in vivo an der Regulation der Zinkhomöostase pankreatischer  $\beta$ -Zellen beteiligt sind.

In isolierten Zellen der Adenohypophyse konnten wir ebenfalls Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignale nachweisen, die durch TRPM3-ähnliche Kanäle hervorgerufen wurden. Diese TRPM3-ähnlichen Kanäle der Hypophyse werden aber nicht ausschließlich von einem bestimmten hormonalen Zelltyp der Hypophyse exprimiert. Es ist daher unwahrscheinlich, dass TRPM3-Kanäle spezifisch die Sekretion eines bestimmten Hormons der Hypophyse beeinflussen. Trotzdem könnten TRPM3-Kanäle eine wichtige Rolle in der Hypophyse spielen, zum Beispiel bei ihrer Entwicklung.

Mit den hier beschriebenen pharmakologischen Hilfsmitteln und den mittlerweile zur Verfügung stehenden TRPM3-defizienten Mäusen besitzen wir nun ein funktionsfähiges System, welches uns erlaubt, sehr gezielt die möglichen physiologischen Funktionen von TRPM3-Kanälen zu untersuchen.

Da mit Abstand die meisten bekannten Wirkungen von Pregnenolonsulfat neurobiologischer Natur sind, wird es von erhöhtem Interesse sein aufzuklären, inwiefern diese durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Effekte auf die Aktivierung von TRPM3-Kanälen zurückzuführen sind.

Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, inwiefern bisher unbekannte zelluläre Faktoren die Sensitivität von TRPM3-Kanälen für Pregnenolonsulfat in Richtung physiologischer Pregnenolonsulfatkonzentrationen verschieben könnten. Ebenso sollte auch die pharmakologische Charakterisierung von TRPM3-Kanälen fortgeführt werden, um weitere, eventuell potentere Agonisten als Pregnenolonsulfat zu identifizieren, die in physiologischen Konzentrationen TRPM3-Kanäle aktivieren.

## Summary

The present study comprises the most comprehensive characterization of TRPM3 channels so far, including the identification of a specific agonist, the functional detection of endogenously expressed TRPM3 channels in primary cells, and the investigation of its possible physiological functions. We show here, that TRPM3 channels can be activated by the chemically totally unrelated agents pregnenolone sulfate and nifedipine. As an endogenously expressed steroid pregnenolone sulfate is of special interest. By using pregnenolone sulfate and nifedipine as pharmacological probes in calcium imaging experiments, we were able to identify endogenously expressed TRPM3 channels. This functional approach is highly efficient and much faster than molecular biological methods. We were thus able to identify endogenous TRPM3 channels in pituitary cells and pancreatic  $\beta$  cells, making it possible to uncover the physiological function of TRPM3 channels in these highly specialized cells. We next studied whether TRPM3 channels contribute to the main physiological functions of these cells. We showed that the activation of TRPM3 channels in pancreatic  $\beta$  cells by pregnenolone sulfate leads to calcium influx and increased insulin secretion from these cells. However, the pregnenolone sulfate concentrations necessary to enhance insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells are much higher than mammalian pregnenolone sulfate plasma concentrations, and it remains therefore unclear whether this mechanism is of physiological relevance. Nevertheless, TRPM3 channels might serve as a new drug target to manipulate  $\beta$  cell function. In this respect an orally available and potent agonist of TRPM3 would probably be a promising candidate for a new antidiabetic drug.

We also investigated, if TRPM3 channels can serve in pancreatic  $\beta$  cells as an entry pathway for zinc. Pancreatic  $\beta$  cells need large amounts of zinc for insulin production and storage, and they lose a lot of zinc when they secrete insulin. Thus,  $\beta$  cells need to take up zinc permanently from the extracellular space. However, the molecular machinery for zinc uptake is still poorly understood. Even though a variety of zinc transporters have been identified in pancreatic  $\beta$  cells, only voltage-gated calcium channels have been shown conclusively to

## *Summary*

---

promote zinc uptake in these cells. We were able to show that significant amounts of zinc can enter pancreatic  $\beta$  cells via TRPM3 channels. It will be interesting to determine in future investigations, whether and to what extent this mechanism contributes to the maintenance of zinc homeostasis in  $\beta$  cells in vivo.

We also found that pregnenolone sulfate activated TRPM3-like channels in cells isolated from the pituitary gland. In these cells, TRPM3-like channels were not confined to a single hormonal cell type. Thus, it seems unlikely that TRPM3 channels affect the secretion of a specific hormone from the pituitary gland. On the other hand, TRPM3 channels might play a role in the development of the pituitary gland.

With the pharmacological probes described in this study and the aid of TRPM3-deficient mice, which became available recently, it is now possible to systematically investigate possible physiological functions of TRPM3 channels.

Since most of the known effects of pregnenolone sulfate are of neurobiologic nature, it will be of great interest to investigate if some of these effects occur due to the activation of TRPM3 channels. Furthermore, it will be of special interest to see, if there are some cellular factors that might increase the sensitivity of TRPM3 for pregnenolone sulfate. Further pharmacological characterization of TRPM3 might lead to the identification of a yet unknown agonist activating the channel in physiological concentrations.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	3
<b>Summary</b> .....	5
<b>1 Allgemeine Einleitung</b> .....	9
<b>2 Pharmakologische Charakterisierung von TRPM3-Kanalproteinen ...</b>	15
2.1 Einleitung.....	16
2.2 Material und Methoden.....	19
2.3 Ergebnisse .....	28
2.4 Diskussion .....	54
<b>3 Identifizierung von Pregnenolonsulfat-sensitiven TRPM3-Kanälen in Hypophysenzellen der Maus</b> .....	57
3.1 Einleitung.....	58
3.2 Material und Methoden.....	63
3.3 Ergebnisse .....	68
3.4 Diskussion .....	74
<b>4 TRPM3-Kanäle verstärken die Insulinsekretion von pankreatischen <math>\beta</math>-Zellen</b> .....	77
4.1 Einleitung.....	78
4.2 Material und Methoden.....	82
4.3 Ergebnisse .....	90
4.4 Diskussion .....	105
<b>5 Pregnenolonsulfat verstärkt die Zinkaufnahme von pankreatischen Inselzellen</b> .....	111
5.1 Einleitung.....	112
5.2 Material und Methoden.....	114

## *Inhaltsverzeichnis*

---

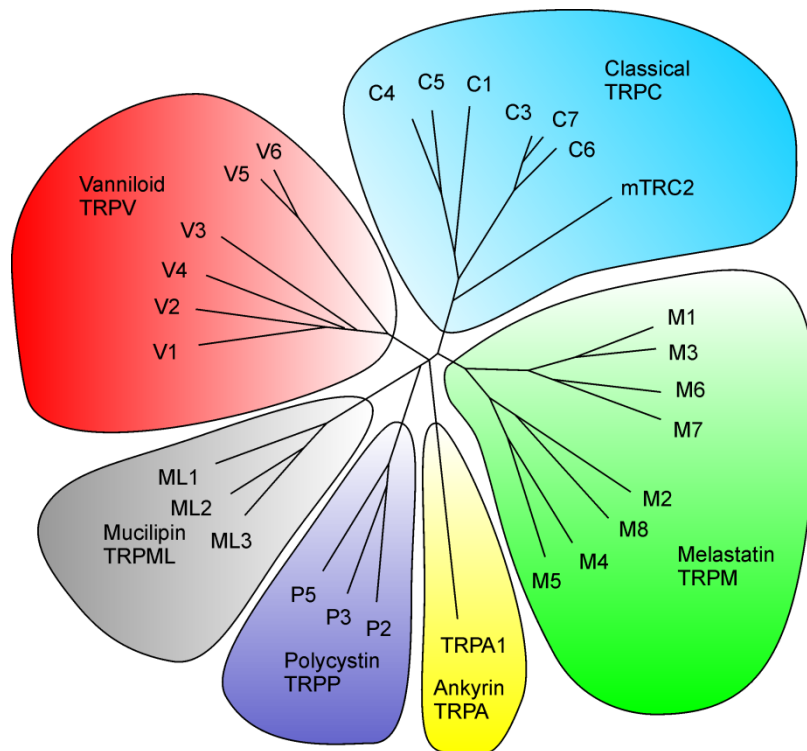
5.3	Ergebnisse .....	116
5.4	Diskussion .....	120
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>139</b>



# 1 Allgemeine Einleitung

Viele Funktionen einer Zelle werden über die Änderung der ionalen Zusammensetzung des Zytosols gesteuert. Besonders Kalziumionen spielen bei fast allen Aspekten des Lebens und auch Sterbens einer Zelle eine wichtige Rolle [1, 2]. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ist unter Ruhebedingungen recht niedrig und beträgt nur etwa 100 nM. Extrazellulär dagegen ist diese etwa 20000-mal höher. Die Öffnung eines Kalziumkanals in der Plasmamembran führt daher, vergleichbar mit der Öffnung eines Fluttores, zu einem Einstrom von Kalziumionen ins Zellinnere. Innerhalb von Millisekunden kann sich die zytosolische Kalziumkonzentration so leicht verzehnfachen. Solche Kalziumsignale sind unter anderem für die regulierte Ausschüttung von Neurotransmittern im Gehirn oder die Freisetzung von Hormonen aus endokrinen Zellen verantwortlich. Kalziumsignale können aber auch über kalziumabhängige Transkriptionsfaktoren direkt die Genexpression einer Zelle beeinflussen [1]. Die Regulation der Aktivität von Ionenkanälen auf zellulärer Ebene ist daher von elementarer Bedeutung für die Funktion des ganzen Organismus, was sich auch darin zeigt, dass viele Krankheiten auf defekte Ionenkanäle zurückzuführen sind [3]. So ist es nicht verwunderlich, dass viele endogene Mediatoren und auch Arzneistoffe ihre Wirkung durch die Aktivierung oder Hemmung bestimmter Ionenkanäle entfalten [4, 5].

Die Familie der TRP-Ionenkanäle (Transient Receptor Potential) von Säugetieren besteht aus 28 Mitgliedern, die in sechs Klassen unterteilt sind [6, 7]. Man unterscheidet TRPC- (canonische), TRPM- (melastatin), TRPV- (vanniloid), TRPA- (ankyrin), TRPML- (mucolipin) und TRPP- (polycystin) Kanäle (Abbildung 1-1). Innerhalb einer Klasse kann die Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Mitgliedern bis zu 90 % betragen. Sequenzhomologien zwischen Vertretern verschiedener Klassen sind dagegen wesentlich geringer [8]. Gemeinsam ist allen TRP-Kanalproteinen, dass sie sechs Transmembrandomänen besitzen. Es wird angenommen, und wurde für manche TRP-Kanäle auch gezeigt [9, 10], dass sich jeweils vier Kanalproteine zusammenlagern, um

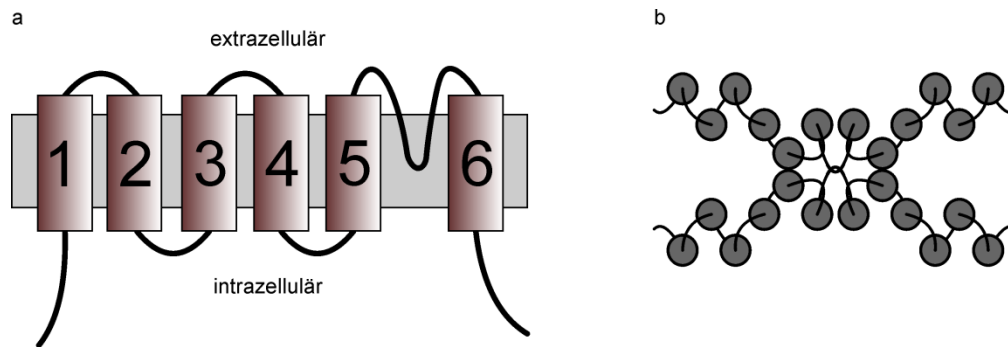


**Abbildung 1-1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle von Säugetieren**

Die Familie der TRP-Kanäle von Säugetieren besteht aus 28 Mitgliedern, die wiederum in sechs Klassen unterteilt sind. (Abbildung adaptiert von [6])

---

einen funktionellen Ionenkanal zu bilden, wobei sich die ionenleitende Pore zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs befinden soll (Abbildung 1-2) [11, 12]. TRP-Kanäle sind dafür bekannt, eine Vielzahl chemischer Stimuli zu detektieren. Die meisten bisher identifizierten Agonisten von TRP-Kanälen stammen aus Pflanzen [13]. Als Arzneistoffe werden jedoch nur wenige dieser Substanzen eingesetzt. So entfalten kühlende Gele ihre Wirkung durch die Aktivierung von TRPM8-Kanälen, die auch bei der Kältewahrnehmung eine Rolle spielen [14]. Wärmesalben dagegen aktivieren TRPV1- und TRPV3-Kanäle, die im Körper bei der Wahrnehmung von Hitze involviert sind [15, 16], und führen dadurch zu einem warmen Gefühl auf der Haut. Bis zum heutigen Tag konnten aber nur wenige körpereigene Substanzen identifiziert werden, die die Aktivität von TRP-Kanälen beeinflussen. Solche endogen gebildete Substanzen sind jedoch sehr interessant, da ihre Wirkung auf TRP-Kanäle eventuell von



**Abbildung 1-2 Schematischer Aufbau eines TRP-Kanals.**

(a) Seitenansicht einer TRP-Kanaluntereinheit. Diese besitzt sechs Transmembrandomänen. N- und C-Terminus befinden sich jeweils intrazellulär. Die ionenleitende Pore befindet sich zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs. (b) Schematische Aufsicht eines TRP-Kanals. Es wird vermutet, dass sich stets vier Kanalproteine zusammenlagern und somit einen funktionellen Kanal bilden.

---

physiologischer Bedeutung ist. Andererseits ist für viele TRP-Kanäle völlig unbekannt, ob ihre Kanalaktivität durch chemische Substanzen beeinflusst werden kann und wie sie physiologisch reguliert werden.

TRPM3-Kanäle gehören zu den bisher am wenigsten erforschten Kanälen der TRP-Familie. Bisher wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die TRPM3-Kanäle aktivieren. Die Entleerung intrazellulärer Speicher soll die Aktivität von TRPM3-Kanälen verstärken [17], was aber auch bestritten wurde [18, 19]. Das Anschwellen der Zelle durch die Applikation einer hypoosmotischen Lösung soll ebenfalls TRPM3-vermittelte Kalziumsignale auslösen [18]. Da TRPM3 in der Niere exprimiert wird, sollen TRPM3-Kanäle aufgrund der genannten Mechanismen an der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase in der Niere beteiligt sein [17, 18]. TRPM3-Kanäle werden neben der Niere auch sehr stark im Gehirn und speziell im choroiden Plexus exprimiert [20-22], weshalb spekuliert wurde, dass sie bei der Regulierung der Funktion des choroiden Plexus eine Rolle spielen [21]. Zur Pharmakologie von TRPM3 wurde bisher gezeigt, dass das Sphingolipid D-erythro-Sphingosin heterolog exprimierte humane TRPM3-Kanäle aktiviert, während das Lanthanoid Gadolinium TRPM3-Kanäle inhibiert [18, 19].

Die Erforschung von TRPM3-Kanälen ist schwierig, da sie aufgrund alternativen Spleißens in einer Vielzahl von Varianten vorliegen [17, 21], die sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften voneinander unterscheiden [21]. Die dramatischsten Unterschiede wurden bisher für die Varianten TRPM3 $\alpha$ 1 und TRPM3 $\alpha$ 2 festgestellt, die sich nur durch eine Deletion von zwölf Aminosäuren und einen zusätzlichen Aminosäurenaustausch in der Porenregion unterscheiden. Überexprimierte TRPM3 $\alpha$ 1- und TRPM3 $\alpha$ 2-Kanäle leiten beide konstitutiv aktive, auswärtsrektifizierende Ströme, die durch intrazelluläres Magnesium inhibiert werden. TRPM3 $\alpha$ 2 leitet divalente Kationen wie Kalzium und Magnesium sehr gut und wird durch extrazelluläres Natrium inhibiert, während beides für TRPM3 $\alpha$ 1-Kanäle nicht gilt [21]. Die Funktion von TRPM3-Kanälen in vivo hängt also davon ab, welche Spleißvariante in welchem Gewebe exprimiert wird. Bisher ist aber von den Geweben, in denen TRPM3-Kanäle auf Transkriptions- oder Proteinebene nachgewiesen wurden, nicht bekannt, welche Spleißvarianten sie exprimieren. Bisher konnten endogen exprimierte TRPM3-Kanäle weder in Zelllinien noch in akut isolierten Zellen funktionell oder anderweitig mit Hilfe von D-erythro-Sphingosin nachgewiesen werden.

Wie wichtig die Verfügbarkeit eines spezifischen Agonisten ist, mit dessen Hilfe endogene Kanäle aktiviert werden können, kann am Beispiel diverser anderer TRP-Kanäle nachvollzogen werden. So konnte mit Hilfe von spezifischen Agonisten gezeigt werden, dass TRPV1, TRPM8 und TRPA1 eine wichtige Rolle bei der Temperaturwahrnehmung einnehmen und in welchen Zellen sie exprimiert werden [23, 24]. Es war daher unser Ziel, einen spezifischen Agonisten von TRPM3-Kanälen zu finden und mit dessen Hilfe Zellen zu identifizieren, die TRPM3-Kanäle exprimieren.

### **Inhaltsübersicht der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist, endogene TRPM3-Kanäle in Zellen funktionell nachzuweisen und die Funktion von TRPM3 in diesen Zellen zu erforschen. Hierzu war es wichtig, einen spezifischen Agonisten von TRPM3 zu finden, da es mit den bisher verfügbaren Mitteln nicht gelungen ist, endogene TRPM3-Kanäle zu identifizieren.

In Kapitel 2 sind Experimente zusammengefasst, deren Ziel es war, einen spezifischen Agonisten von TRPM3-Kanälen zu identifizieren. Mit Pregnenolonsulfat und Nifedipin wurden sogar zwei chemisch völlig unterschiedliche Substanzen gefunden, die heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle aktivieren.

Die in Kapitel 3 zusammengefassten Ergebnisse zeigen zudem, dass mit Hilfe dieser pharmakologischen Werkzeuge endogene TRPM3-Kanäle in Hypophysenzellen funktionell nachgewiesen werden können. Mit dem Ziel herauszufinden, ob TRPM3-Kanäle wichtig für die Funktion eines bestimmten Hypophysenzelltyps sind, wurde untersucht, ob Kalziumsignale, die durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat ausgelöst werden, an die Expression eines bestimmten Hormons des Hypophysenvorderlappens gebunden waren und daher nur in einem bestimmten Hypophysenzelltyp vorkommen. Unsere Ergebnisse bilden die Grundlage für die weitere Erforschung der Funktion von TRPM3 in diesen Zellen.

Mit dem Ziel weitere Zellen zu identifizieren, die TRPM3-Kanäle exprimieren und so der physiologischen Funktion von TRPM3 ein Stück näher zu kommen, wurden Zelllinien und Zellen in Primärkultur verschiedensten Ursprungs auf durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Kalziumsignale durchforstet. Mit Hilfe dieser in Kapitel 4 dargestellten Versuche konnten TRPM3-Kanäle funktionell in den Insulinomazelllinien INS1 und MIN6 nachgewiesen werden. Weitere Versuche zeigten, dass Pregnenolonsulfat-sensitive Kanäle nur von Insulin produzierenden pankreatischen  $\beta$ -Zellen der Maus exprimiert werden, nicht aber von den  $\alpha$ -Zellen, die Glukagon bilden. Daher wollten wir untersuchen, ob TRPM3-Kanäle zur physiologischen Funktion der  $\beta$ -Zellen, nämlich der Insulinsekretion beitragen können. Durch die gleichzeitige Messung der Kalziumsignale und der Insulinfreisetzung von pankreatischen Inseln wurde gezeigt, dass die durch Pregnenolonsulfat vermittelten Kalziumsignale pankreatischer Inseln deren Insulinsekretion verstärken. Experimente mit primär kultivierten pankreatischen Zellen und Inseln von TRPM3-defizienten Mäusen zeigten, dass TRPM3-Proteine eine essentielle Untereinheit des Steroid-aktivierten Kalziumkanals pankreatischer  $\beta$ -Zellen bilden und auch an der Steroid-induzierten Erhöhung der Insulinsekretion von pankreatischen Inseln beteiligt sind.

Zink spielt eine entscheidende Rolle bei der Synthese und Speicherung von Insulin pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Es ist aber wenig darüber bekannt, wie das benötigte Zink in die  $\beta$ -Zellen gelangt. Nachgewiesen wurde bisher nur, dass spannungsabhängige Kalziumkanäle zur Zinkaufnahme beitragen [25]. Pregnenolonsulfat-aktivierte TRPM3-Kanäle könnten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase von pankreatischen Inselzellen spielen, da auch sie Zinkionen gut leiten [26]. In Kapitel 5 wurde dieser Aspekt mittels der fluorometrischen Messung der intrazellulären Zinkkonzentration von pankreatischen Inselzellen untersucht. Wir konnten zeigen, dass TRPM3-Kanäle, unabhängig von spannungsabhängigen Kalziumkanälen, zur regulierten Aufnahme von Zinkionen, und somit zur Zinkhomöostase der  $\beta$ -Zellen beitragen können.

## 2 Pharmakologische Charakterisierung von TRPM3-Kanalproteinen<sup>1</sup>

### Zusammenfassung

Im Körper spielen Ionenkanäle bei vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Zu den Charakteristiken eines Ionenkanals gehören seine biophysikalischen und pharmakologischen Besonderheiten. So gut die biophysikalischen Eigenschaften von TRPM3-kodierten Ionenkanälen bereits beschrieben wurden [21, 26], so wenig wissen wir über die Pharmakologie dieser Kanäle. Daher war es unser Ziel, TRPM3-Kanäle pharmakologisch zu charakterisieren. Hierzu wurde die Wirkung verschiedener Substanzklassen auf TRPM3-Kanäle mit Hilfe von Fura-2-basierten fluorometrischen Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration untersucht. Wir konnten zeigen, dass TRPM3, im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer TRP-Kanäle, durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat aktiviert werden kann. Die Aktivierung von TRPM3 erfolgt dabei mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Bindung von Pregnenolonsulfat an eine chirale Bindungsstelle. Neben Pregnenolonsulfat aktiviert auch Nifedipin, ein Dihydropyridin, welches strukturell von Pregnenolonsulfat völlig verschieden ist, TRPM3. Das bekannte pharmakologische Profil dieses Kanals wird dadurch weiter geschärft. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten pharmakologischen Werkzeuge eröffnen erstmalig die Möglichkeit, endogene TRPM3-Kanäle in Geweben funktionell nachzuweisen. Da TRPM3-Kanäle gerade im Gehirn sehr stark exprimiert werden [21, 22] wird es interessant sein, zu untersuchen, ob und zu welchem Ausmaß die diversen für Pregnenolonsulfat beschriebenen neurophysiologischen Effekte [27, 28] auf die Aktivierung von TRPM3-Kanälen zurückzuführen sind.

---

<sup>1</sup> Teile der in diesem Kapitel dargestellten Versuche wurden, zusammen mit Ergebnissen aus Kapitel 4, in der Publikation Wagner et al. NCB (2008) veröffentlicht [28].

## **2.1 Einleitung**

TRPM3-Kanäle gehören zur großen Familie der TRP-Kanäle. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der TRP-Familie, die pharmakologisch und biophysikalisch teilweise sehr gut charakterisiert wurden [7, 11, 29], ist über TRPM3 nur sehr wenig bekannt. Es wurde bisher gezeigt, dass TRPM3-Kanäle sehr stark im Gehirn exprimiert werden [22] und in einer Vielzahl unterschiedlicher Spleißvarianten vorkommen [17, 21]. Die biophysikalischen Eigenschaften alternativer gespleißter TRPM3-Ionenkanäle unterscheiden sich zum Teil deutlich voneinander. Dies wird bei der Betrachtung zweier Varianten, TRPM3 $\alpha$ 1 und TRPM3 $\alpha$ 2, die sich nur durch eine Deletion von zwölf Aminosäuren und einen zusätzlichen Aminosäureaustausch in der Porenregion unterscheiden, sehr deutlich. Beide Varianten induzieren konstitutiv aktive und auswärtsrektifizierende Ströme, die durch intrazelluläres Magnesium inhibiert werden. Hier enden aber auch schon die Gemeinsamkeiten dieser TRPM3-Varianten. Während die TRPM3 $\alpha$ 2-Variante divalente Kationen wie Kalzium und Magnesium gut leitet, so gilt dies nicht für TRPM3 $\alpha$ 1. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass extrazelluläres Natrium die Aktivität von TRPM3 $\alpha$ 2-Kanälen unterdrückt, während TRPM3 $\alpha$ 1-Kanäle nicht durch extrazelluläre, monovalente Kationen in ihrer Aktivität beeinflusst werden [21].

Bisher wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die TRPM3-Kanäle aktivieren. Lee et al. zeigen, dass die Entleerung intrazellulärer Speicher die Aktivität von TRPM3-Kanälen verstärkt [17] was jedoch an anderer Stelle bestritten wird [18, 19]. Eine andere Studie besagt, dass durch die Applikation von hypoosmotischer Lösung und das daraus resultierende Anschwellen der Zelle TRPM3-vermittelte Kalziumsignale ausgelöst werden können [18]. Desweiteren wurde für TRPM3-Kanäle berichtet, dass sie durch das endogen vorkommende Sphingolipid D-erythro-Sphingosin aktiviert sowie durch das Lanthanoid Gadolinium inhibiert werden [17, 19]. Ein weiterer Blocker von heterolog exprimierten TRPM3-Kanälen ist 2-Aminoethyl Diphenylborinat (2-APB) [30]. Aufgrund des Expressionsmusters und der eben beschriebenen Eigenschaften von heterolog exprimierten TRPM3-Proteinen, wurden bisher diverse potentielle Funktionen von TRPM3-Kanälen, etwa bei der Kalziumresorption in der Niere oder im Ge-



hirn bei der Regulation der Funktion des choroiden Plexus, diskutiert [17, 18, 21]. Funktionell konnten endogen exprimierte TRPM3-Kanäle aber bisher in keinem dieser Gewebe nachgewiesen werden. Der Hauptgrund hierfür besteht darin, dass bisher keine adäquaten pharmakologischen Mittel zur Charakterisierung von TRPM3-Kanälen zur Verfügung stehen.

Mit dem Ziel, einen spezifischen Agonisten von TRPM3 zu identifizieren, wurde daher die Wirkung von verschiedenen Substanzklassen auf heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle untersucht.

Dabei konnten wir Steroide identifizieren, die TRPM3-Kanäle aktivieren. Steroide sind eine große Gruppe von Substanzen, die im Körper von Säugetieren enzymatisch aus Cholesterol gebildet werden. Viele Steroide entfalten ihre Wirkung durch die Änderung der Genexpression, indem sie an Steroidrezeptoren binden und so die Gentranskription beeinflussen [31]. Diese genomischen Steroideffekte entfalten ihre Wirkung nach mehreren Stunden oder Tagen. Es wurden aber auch schnelle, nicht genomische Wirkmechanismen von Steroiden beschrieben, die auf die Aktivierung oder Inhibition von membranständigen Rezeptoren zurückzuführen sind [32]. Einige dieser Steroidrezeptoren in der Zellmembran von Säugetieren sind Ionenkanäle. Ein Steroid, für das sehr viele solche nicht klassischen Wirkungsmechanismen beschrieben wurden, ist Pregnenolonsulfat. Dieses endogen gebildete Neurosteroid moduliert die Aktivität von NMDA-, AMPA-, Kainat- sowie GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Darüber hinaus verstärkt Pregnenolonsulfat die Aktivierung von spannungsabhängigen Kalium- und Kalziumkanälen [33-37]. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass Pregnenolonsulfat die Neurotransmitterausschüttung erhöht und die Stärke der synaptischen Übertragung beeinflusst. Verhaltensstudien zeigten, dass es die Gedächtnisbildung fördert [28]. Auch wenn bereits viele Proteine identifiziert wurden, die durch Pregnenolonsulfat in ihrer Funktion moduliert werden, so bleibt es unklar ob diese Effekte alle physiologischen und verhaltensbeeinflussenden Eigenschaften von Pregnenolonsulfat erklären können.

Die zweite Gruppe, in der wir Substanzen fanden, die TRPM3-Kanäle in ihrer Aktivität beeinflussen, waren Kalziumkanalblocker. Diese synthetisch hergestellten Arzneistoffe werden hauptsächlich zur Behandlung von Bluthoch-

druck, koronarer Herzkrankheit und Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Ihren Namen verdanken sie ihrem Wirkmechanismus: sie verringern den Einstrom von Kalziumionen ins Innere der Muskelzelle durch die Inhibition von spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Dadurch wird vor allem die Kontraktilität der glatten Gefäßmuskeln herabgesetzt, was die Blutgefäße erweitert. Der spezifischen chemischen Grundstruktur der Kalziumkanalblocker entsprechend unterteilt man drei Typen. Man unterscheidet Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine, wobei nur Dihydropyridine TRPM3-Kanäle in ihrer Aktivität beeinflussen.

Die Resultate dieses Kapitels zeigen, dass die Aktivität von TRPM3 durch zwei chemisch völlig verschiedene Substanzklassen beeinflusst werden kann.

## **2.2 Material und Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Für TRPM3 wurden eine Vielzahl von Spleißvarianten beschrieben [17, 21]. In dieser Arbeit wurde nur die Variante TRPM3 $\alpha$ 2 (Accession Nr.: AJ544535) verwendet. Diese bildet Kanäle aus, die Kalziumionen gut leiten und deshalb geeignet sind, um fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Fura-2 durchzuführen. HEK293 [38] und HEK293 Zellen, die stabil Myc-TRPM3-EYFP exprimieren [21] (also ein TRPM3 $\alpha$ 2 Fusionsprotein, welches N-terminal ein Myc-Tag und C-terminal ein gelb fluoreszierendes Protein besitzt), wurden in MEM-Medium (Invitrogen), welches 10 % fetales Kälberserum (FKS, Sigma Aldrich) enthielt, kultiviert und zweimal oder dreimal pro Woche passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. PBS wurde abgesaugt und die Zellen mit 3 ml 1x Trypsin-EGTA-Solution (Sigma Aldrich) behandelt. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten, wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden daraufhin mit Hilfe einer serologischen Pipette tituiert und dadurch vereinzelt. Die vereinzelt Zellen wurden verdünnt und in eine neue Kulturflasche ausgesät oder auf mit Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich) beschichteten Deckgläschen kultiviert. Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen wurden stets kurz vor Verwendung durch eine 30 minütige Inkubation mit sterilfiltriertem 0.1 % Poly-L-Lysin in Wasser hergestellt. Die so behandelten Deckgläschen wurden anschließend mit sterilem Wasser dreimalig gewaschen.

Ebenso wurden stabil mit TRPM8 [9] und TRPV6 [39] transfizierte HEK293 Zelllinien behandelt. Für alle Untersuchungen mit TRPV4 und TRPM2 wurden HEK293 Zellen transient mit Expressionsvektoren, die TRPV4 [40] oder TRPM2 [41] enthielten, transfiziert. TRPV4 lag in einem IRES-GFP Vektor vor, der es erlaubte, transfizierte Zellen an ihrer GFP-Fluoreszenz zu identifizieren. TRPM2-Vektoren enthielten kein Reportergen und wurden daher stets mit einem eYFP-Vektor kotransfiziert, um transfizierte Zellen anhand der eYFP-Fluoreszenz identifizieren zu können. Alle transfizierten Zellen wurden

einen Tag nach Transfektion auf Poly-L-Lysin beschichtete runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 25 mm vereinzelt und wiederum einen Tag darauf für Experimente verwendet.

## **2.2.2 Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Fura-2**

Zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden fluorometrische Kalziummessungen mit Fura-2 durchgeführt [42]. Hierfür wurden die Zellen mit 2.5  $\mu$ M Fura-2-AM (Molecular Probes / Invitrogen oder Mobitech) im jeweiligen Zellkulturmedium bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Fura-2-AM Stocklösungen wurden in einer Konzentration von 1 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich) hergestellt und entsprechend zum Medium hinzugefügt. Vor Beginn jedes Experiments wurden die Zellen dreimalig mit der während des Versuchs verwendeten Badlösung gewaschen. Alle Experimente, bis auf die mit transient mit TRPM2 / eYFP kotransfizierten Zellen, wurden bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Ableitkammer (RC-21BR, Warner Instruments) durchgeführt. Experimente mit TRPM2 und eYFP kotransfizierten Zellen wurden bei 37 °C mit Hilfe eines Vorheizers (SF-28, Warner Instruments) und einer heizbaren Plattform (PM-2, Warner Instruments) durchgeführt. Beide Heizelemente wurden mit Hilfe eines Steuerelements (TC-344B, Warner Instruments) kontrolliert. Die Lösungen wurden während der Experimente mit Hilfe eines selbstgebauten gravitationsbetriebenen Perfusionssystems gewechselt. Dabei betrug die Perfusionsrate während allen Experimenten ungefähr 1 ml / min.

Alle Lösungen, die für die fluorometrischen Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration verwendet wurden, basierten auf der gleichen Standardlösung. Diese enthielt (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES und 10 Glukose (alles Sigma Aldrich). Der pH-Wert wurde mit 2 M CsOH (Sigma Aldrich) auf 7,2 eingestellt, wodurch die Lösung zusätzlich 2 - 3 mM Cs<sup>+</sup> enthielt. Die Osmolalität dieser Lösung wurde mit einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotec) gemessen und lag zwischen 310 und 320 mosmol / kg. Die monovalentfreie, 10-mM-kalziumhaltige Lösung (mvf, 10 mM Ca<sup>2+</sup>) enthielt (in mM): 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES und 267 Glukose. Der pH-Wert wurde mit 2 M CsOH (Sigma Aldrich) auf 7,2 eingestellt, wodurch die

Lösung ebenfalls zusätzlich 2 - 3 mM Cs<sup>+</sup> enthält. Die Osmolalität dieser Lösung lag zwischen 310 und 320 mosmol / kg. Nominal kalziumfreie Lösung (kalziumfrei) wurde wie die Standardlösung hergestellt, jedoch enthielt sie kein CaCl<sub>2</sub> und auch kein MgCl<sub>2</sub>. Die Osmolalität dieser Lösung wurde durch Zugabe von Glukose ausgeglichen, so dass sie ebenfalls 310 - 320 mosmol / kg betrug. Die applizierten Substanzen wurden der Standardlösung entweder direkt in der benötigten Konzentration zugegeben oder in einem Lösungsmittel gelöst und durch Zugabe der entsprechenden Menge dieser konzentrierten Stocklösung zur Standardlösung hergestellt. Eine genaue Aufstellung aller verwendeten Substanzen und der verwendeten Lösungsmittel wurden in Tabelle 2-1 bis Tabelle 2-7 aufgeführt. Ent-Pregnenolonsulfat (ent-PS) wurde von Dr. Douglas F. Covey (Department of Developmental Biology, Washington University, St. Louis) wie beschrieben synthetisiert [43] und uns zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2-1: Kalziumkanalblocker**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
Verapamil	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Nifedipin	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50/100 µM 50 µM
Nicardipin	10 mM 50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	10 µM
Nimodipin	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Nitrendipin	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Isradipin	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Diltiazem	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM

**Tabelle 2-2: Neurotransmitter**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
Adrenalin	10 mM	1 M HCl	Sigma-Aldrich	1 mM
Noradrenalin	50 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
Serotonin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
Histamin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
GABA	10 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
Taurin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
Acetylcholin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
Adenosin	500 µM	-/-	Sigma-Aldrich	1 mM

**Tabelle 2-3: Steroidhormone**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
Pregnenolon	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Pregnenolonsulfat	3,5 mM 50 mM	Wasser DMSO	Sigma-Aldrich Sternaloids	35 µM 50 µM
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
DHEA-Sulfat	50 mM	Methanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Progesteron	6,5 mM 50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	6,5 µM 50 µM
Cholesterol	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM 50 µM
Cholesterolsulfat	10,2 mM	Methanol	Sigma-Aldrich	10,2 µM
Allopregnanolon	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Östriol	16,7 mM 50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	16,5 µM 50 µM
Östradiol	50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Östron	12,5 mM 50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	12,5 µM 50 µM
Hydrokortison	25 mM 50 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich	25 µM 50 µM
Kortikosteron	25 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	25 µM
Ouabain	6,85 mM 500 µM	Wasser -/-	Sigma-Aldrich	13,7 µM 500 µM
Ponasteron A	10 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	10 µM
Pregnenolonglukoronid	34 mM	DMSO	Sternaloids	34 µM
Epiallopregnanolon	33 mM	DMSO	Sternaloids	33 µM
Östron-3-Sulfat	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Pregnenolonmethylether	25 mM	DMSO	Sternaloids	25 µM
16α-Hydroxy-DHEA	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
β-Östradiol-3-Sulfat	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Aldosteron	20 mM	Ethanol	Sigma- Aldrich	20 µM
Dexamethason	50 mM	DMSO	Sigma- Aldrich	50 µM
Testosteron	50 mM	DMSO	Sigma- Aldrich	50 µM
7α-Hydroxy-DHEA	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
Pregnanolonsulfat	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
Androstendion	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
Pregnenolonacetat	33 mM	DMSO	Sternaloids	33 µM
16-Dehydro-Pregnenolon	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
17α-Hydroxy-Pregnenolon	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
Pregnenolonhemisuccinat	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
Allopregnanolon	50 mM	DMSO	Sternaloids	50 µM
ent-Pregnenolonsulfat	50 mM	DMSO	Douglas F. Covey	50 µM

**Tabelle 2-4: Agonisten & Antagonisten von TRP-Kanälen**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
Menthol	10 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	10 µM
Senföl	100 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	100 µM
Capsaicin	100 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	100 µM
Gadolinium	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
D-erythro-Sphingosin	20 mM	Ethanol DMSO	Sigma-Aldrich Calbiochem	20 µM

**Tabelle 2-5: weitere Substanzen**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
NADH	-/-	-/-	Sigma-Aldrich	1 mM
Oxytocin	10 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	10 µM
Thyreoliberin (TRH)	40 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	40 µM
Trinitrophenol	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	50 µM
Chlorpromazin	500 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	500 µM
(+) Carvon	1 M	DMSO	Roth	1 mM
(-) Carvon	1 M	DMSO	Roth	1 mM
8-Bromo-cAMP	100 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	100 µM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-/-	-/-	Sigma-Aldrich	2 mM

**Tabelle 2-6: Cannabinoide**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
Δ <sup>9</sup> -Tetrahydrocannabinol (THC)	80 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	80 µM
Anandamid	40 mM	Ethanol	Sigma-Aldrich	20 µM
WIN 55,212-2	23 mM	DMSO	Sigma-Aldrich	23 µM

**Tabelle 2-7: L-Aminosäuren**

Substanz	Stocklösung	Lösungsmittel	Hersteller	Endkonzentration
L-Alanin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Arginin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Asparagin	1 M	1 M HCl	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Aspartat	1 mM	-/-	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Cystein	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Glutamat	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Glutamin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Glycin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Histidin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Isoleucin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Leucin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Lysin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Methionin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Phenylalanin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Prolin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Serin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Threonin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Tryptophan	1 M	1 M HCl	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Tyrosin	250 mM	1 M HCl	Sigma-Aldrich	1 mM
L-Valin	100 mM	Wasser	Sigma-Aldrich	1 mM

### **Optischer Aufbau**

Alle Versuche wurden mit einem inversen Mikroskop (Eclipse TE 2000, Nikon) durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine 100 Watt Quecksilberdampfampe (Brenner: Nikon; Lampe: Mercury short arc HBO, Osram). Zur Anregung des Fura-2 Farbstoffes wurde das Licht durch Filter für 340 nm (D340/13, AHF Analysentechnik) beziehungsweise 380 nm (D380/13, AHF Analysentechnik) geleitet, die mit Hilfe eines Filterrades (LUDL) in den Strahlengang eingebracht wurden. Über einen Shutter wurde das Licht zwischen den Messungen abgeschaltet, um das Bleichen des Farbstoffes durch das Anregungslicht zu minimieren. Nachdem das Licht den Anregungsfilter passiert hatte, traf es auf den Fluoreszenzblock des Mikroskops. Hier wurde das Anregungslicht durch einen dichroischen Spiegel (400 DCLP, AHF Analysentechnik) auf das Objekt umgeleitet. Ein für ultraviolettes Licht optimiertes 10x Objektiv (SFluor N.A. 0.5, Nikon) leitete das Licht auf die Fura-2-geladenen Zellen. Nicht durch den dichroischen Spiegel gefiltertes Fura-2-unspezifisches Emissionslicht, wurde durch einen weiteren bei 510 nm Wellenlänge durchlässigen Emissionsfilter (D510/40, AHF Analysentechnik) minimiert. Die Intensität des Emissionslichtes wurde mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera (Retiga Exi, QImaging) aufgezeichnet.

### **Steuerung des Messstandes**

Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten (Filterrad, Shutter und CCD-Kamera) des Messstandes wurde über ein CED1401 Interface (Cambridge Electronic Design) mit Hilfe der Software WinWCP (Version 3.4.4., Dr. John Dempster, Strathclyde) gesteuert. Alle fünf Sekunden wurden im Abstand von 800 ms zwei Bilder bei 340 nm und 380 nm Anregungswellenlänge von der CCD-Kamera aufgenommen. Das Filterrad wurde 150 ms vor jeder Aufnahme auf den jeweiligen Filter gedreht. Um zu gewährleisten, dass die Emission bei maximaler Anregung detektiert wurde, wurde der Shutter 50 ms vor jeder Aufnahme geöffnet. Nachdem über das CED1401 Interface der Auslöseimpuls für die Kamera gegeben wurde, wurde -über die Software QCapture5 (QImaging) gesteuert- ein Bild mit einer Belichtungszeit von 150 ms aufge-



nommen. Für jede Aufnahme blieb der Shutter 250 ms geöffnet, was zu einer Minimierung des Bleichens des Farbstoffes beitrug.

### **Analyse der Fluoreszenzbilder**

Die Auswertung der Bilder wurde mit ImageJ (1.37v, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) und einer auf unsere Bedürfnisse angepassten Variante des „RatioPlus Plugins“ vorgenommen. Zur Hintergrundkorrektur wurde ein möglichst großer Bereich, der keine Zellen enthielt, als auszuwertender Bereich (ROI, Region of interest) markiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität dieser ROI wurde für jedes Bild einzeln ermittelt und als Hintergrundfluoreszenz subtrahiert. Aus den so entstandenen Bildern wurde jeweils Pixel für Pixel der Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm nach Anregung mit Licht von 340 nm und 380 nm gebildet (Fura-2-Signal). Pixel, deren Fluoreszenzintensität nur wenig von der Hintergrundfluoreszenz unterschiedlich waren (weniger als 100 Einheiten des unbearbeiteten, von der Kamera gelieferten Intensitätswertes), wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zellen, die während eines Experimentes untersucht wurden, wurden durch eine ROI markiert und der zeitliche Verlauf des mittleren Fura-2-Signals jeder ROI aufgezeichnet.

### **Analyse der Daten**

Zur quantitativen Analyse der Kalziumsignale der pharmakologischen Untersuchungen an heterolog exprimierten TRPM3-Kanälen wurde die Änderung des Fura-2-Signals ( $\Delta 340/380$ ) nach Applikation der Testsubstanz gegenüber dem basalen Kalziumsignal ermittelt. Die Änderungen wurden für jede Zelle einzeln erfasst und anschließend gemittelt.

### **2.2.3 Patch-Clamp-Experimente**

#### **Durchführung**

Es wurden Gigaseal, Spannungsklemme Experimente durchgeführt [44]. Die Patch-Pipetten wurden mit Hilfe eines Pipettenpullers (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH) aus Borosilikatglas (GB150F-8P, Science Products GmbH) hergestellt. Der Pipettenwiderstand betrug stets zwischen 3 und 5 M $\Omega$ .

Alle Patch-Clamp-Experimente wurden in der Ganzzellkonfiguration bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurde ein Patch-Clamp-Verstärker (EPC-7, HEKA) verwendet. Zur Untersuchung der Stromentwicklung wurden Spannungsrampenprotokolle von -100 mV bis +100 mV (unkorrigiert) in Schritten von 1 mV / ms bei einer Frequenz von 1 Hz appliziert. Das Haltepotential betrug dabei 0 mV (unkorrigiert). Um den Verstärker zu steuern und die Ströme aufzunehmen und zu visualisieren wurde ein ITC-18 Interface (Instrutech) und die Software Patchmaster (v2.15, HEKA) verwendet.

Die Pipettenlösung enthielt (in mM): 80 CsAsp, 45 CsCl, 10 EGTA, 5 EDTA, 10 HEPES, 4 Na<sub>2</sub>ATP. Der pH-Wert wurde mit 2 M CsOH auf 7.2 eingestellt, wodurch die Lösung zusätzlich 60 – 75 mM Cs<sup>+</sup> enthielt. Die Osmolalität betrug zwischen 300 und 315 mosmol / kg. Die Extrazellulärlösung enthielt (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 mM Mannitol. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.2 eingestellt, wodurch die Lösung zusätzlich 2 - 3 mM Na<sup>+</sup> enthielt. Die Osmolalität betrug 315 - 320 mosmol / kg. 50 mM Stocklösungen von Pregnenolonsulfat (Sigma Aldrich oder Steraloids) sowie 1 mM Stocklösungen von 4- $\alpha$ -Phorbol 12,13-didecanoat (4 $\alpha$ PDD, Sigma Aldrich) wurden in DMSO bereitet. Extrazellulärlösungen mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat oder 1  $\mu$ M 4 $\alpha$ PDD wurden durch Zugabe von Pregnenolonsulfat beziehungsweise 4 $\alpha$ PDD-Stocklösung hergestellt, so dass die DMSO-Konzentration dieser Lösungen 1 ‰ nicht überschritt. Alle Lösungen wurden lokal über ein selbstgebautes gravitationsbetriebenes Perfusionssystem appliziert, dessen Ausgang weniger als 200  $\mu$ m neben der gemessenen Zelle platziert wurde.

### **Analyse der Daten**

Alle Potentialwerte wurden bei der Auswertung um ein Liquid junction potential von -15 mV korrigiert. Die Stromentwicklung von mit TRPV4 transfizierten Zellen und nicht transfizierten HEK293 Zellen über die Zeit wurde für den Einwärtsstrom bei -80 mV und +80 mV (korrigiert) für den Auswärtsstrom ausgewertet. Die Analyse der Daten erfolgte mit Igor Pro 5.0.1.0 (Wavemetrics Inc.) unter Zuhilfenahme des „Patcher's Power Tools“ Plugins (Version 2.12; De-

partment of Membrane Biophysics at MPI Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany), Excel 2003 (Microsoft Inc.) und Origin 7.0 (Originlab Corporation).

#### **2.2.4 Statistische Analyse**

Die Auswertung und statistische Analyse der Daten wurde mit Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Washington, USA) und Origin 7.0 (OriginLab, Massachusetts, USA) durchgeführt. Mit Hilfe von gepaarten oder ungepaarten t-Test Analysen nach Student, wurden Unterschiede zwischen Datensätzen untersucht. Statistische Daten sind stets als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Ein p-Wert von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

## **2.3 Ergebnisse**

### **2.3.1 TRPM3 wird durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin aktiviert**

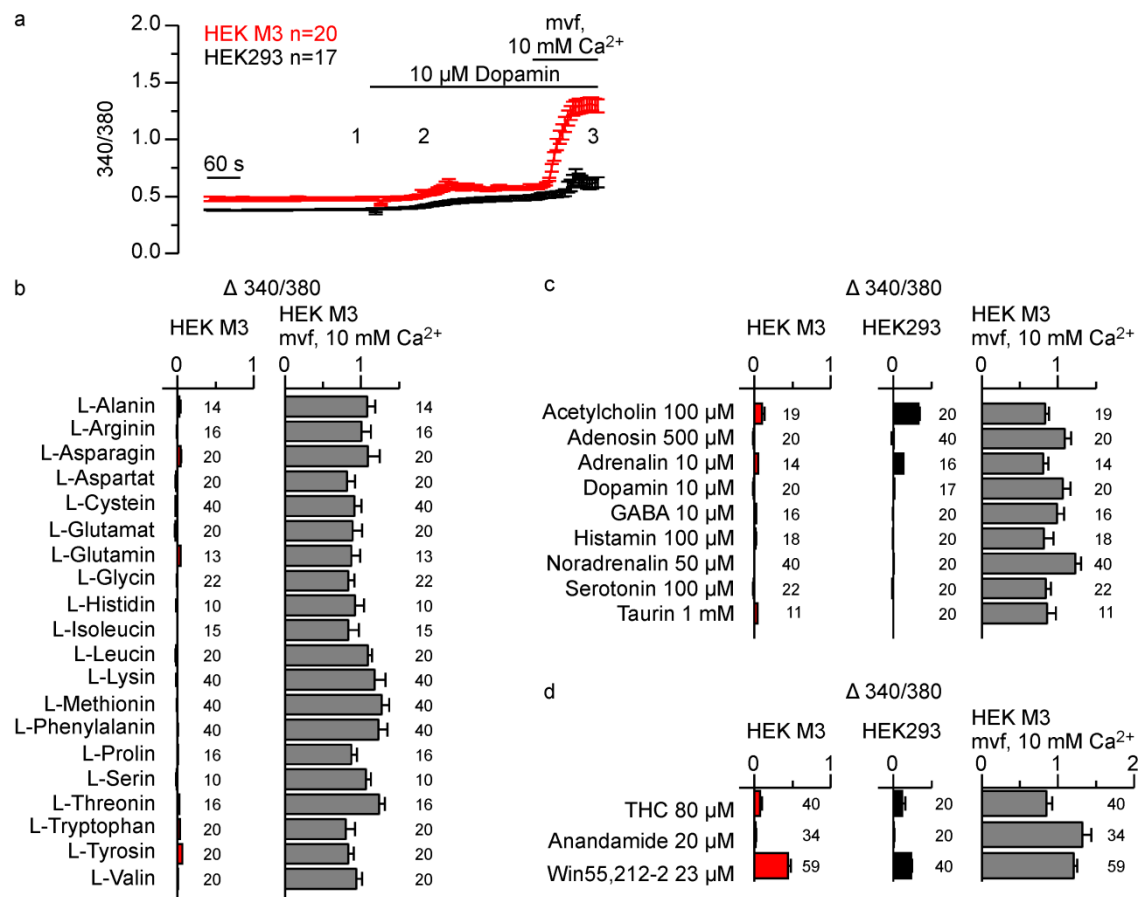
Spleißvarianten von TRPM3 unterscheiden sich unter anderem durch ihre Ionen-selektivität. Die TRPM3 $\alpha$ 2-Spleißvariante leitet divalente Kationen sehr gut [21], wodurch die Kanalaktivität von TRPM3 $\alpha$ 2 mit Hilfe von fluorometrischen Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration verfolgt werden kann. Zudem werden diese Kanäle durch extrazelluläres Natrium inhibiert [21, 45]. Durch die Entfernung aller monovalenten Kationen aus der Badlösung bei gleichzeitiger Erhöhung der Kalziumkonzentration von 2 mM auf 10 mM ist es bei TRPM3 $\alpha$ 2-exprimierenden Zellen möglich, Kalziumsignale auszulösen, die auf die Expression von TRPM3 zurückzuführen sind [46]. Daher wurde bei allen Experimenten eine stabil mit TRPM3 $\alpha$ 2 transfizierte HEK293 Zelllinie verwendet. Im Rest dieses Kapitels wird diese Variante immer nur TRPM3 genannt. Als Kontrolle dienten bei allen Experimenten nicht transfizierte HEK293 Zellen, die endogen keine TRPM3-Kanalproteine exprimieren [21].

Aufgrund der starken Expression von TRPM3 im Gehirn wurde die Wirkung neuroaktiver Substanzen auf rekombinante TRPM3-Kanäle untersucht. Bei allen in Abbildung 2-1 dargestellten Experimenten wurden die Substanzen und Lösungen, wie in Abbildung 2-1a beispielhaft für Dopamin gezeigt, appliziert. Die rote Spur zeigt den Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von HEK293 Zellen, die stabil TRPM3 exprimieren. Die schwarze Spur zeigt entsprechend den Verlauf für Kontrollzellen. Dieses Protokoll erlaubte es, anhand der Änderung des Fura-2-Signals zu untersuchen, ob eine in der Badlösung applizierte Testsubstanz TRPM3 aktivieren kann. Als Maß hierfür wurde die Änderung des Fura-2-Signals ( $\Delta$  340/380) zwischen den Punkten 1 und 2 des Perfusionsprotokolls von TRPM3-exprimierenden (Abbildung 2-1b-d rote Balken) und Kontrollzellen (Abbildung 2-1b-d schwarze Balken) ausgewertet. Im gleichen Experiment konnte auch überprüft werden, ob eine Testsubstanz die TRPM3-Kanalaktivität unterdrückt. Hierzu wurde gemessen, inwiefern eine Substanz die Zunahme des Fura-2-Signals ( $\Delta$  340/380) von TRPM3-exprimierenden Zellen in monovalentfreier 10-mM-kalziumhaltiger Lösung

(Abbildung 2-1b-d, graue Balken), also zwischen den Punkten 1 und 3 des Perfusionprotokolls, unterdrückte. Dabei wurde der Fokus stets auf deutliche Effekte gelegt, kleine Effekte wurden nicht weiter verfolgt.

Diverse Aminosäuren, wie zum Beispiel Glutamat, fungieren im Körper und speziell im Gehirn als wichtige Botenstoffe und entfalten ihre Wirkung an diversen Rezeptoren [47]. Aufgrund dessen untersuchten wir, ob die Kanalaktivität von TRPM3 durch eine der 20 natürlich vorkommenden L-Aminosäuren beeinflusst wird. Abbildung 2-1b zeigt die statistische Auswertung dieser Experimente. Keine der getesteten L-Aminosäuren führte in einer Konzentration von 1 mM zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden Zellen. Folglich aktivierte keine der L-Aminosäuren TRPM3. Die Zunahme der Fura-2-Signale von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen nach Applikation der jeweils getesteten Aminosäure in einer monovalentfreien 10-mM-kalziumhaltigen Lösung, wurde in keinem Fall deutlich vermindert geschweige denn vollkommen unterdrückt. Daher hatte keine der getesteten Aminosäuren eine inhibierende Wirkung auf TRPM3-Kanäle.

Neben L-Aminosäuren gibt es im Gehirn noch weitere Substanzen, die als Botenstoffe Ionenkanäle und andere Rezeptoren beeinflussen [48]. Wir testeten die Wirkung einer Auswahl solcher Neurotransmitter genannten Stoffe auf heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle. Alle getesteten Neurotransmitter zeigten während der Applikation in der Badlösung keinerlei Effekte auf das Fura-2-Signal von TRPM3-exprimierenden Zellen, die nicht auch bei Kontrollzellen in gleichem oder sogar höherem Maße beobachtet wurden. Wenn das Fura-2-Signal von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen (Abbildung 2-1c, rote Balken) durch Zugabe einer dieser Substanzen anstieg, so war dies stets auch bei nicht transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 2-1c, schwarze Balken) in vergleichbarer Art und Weise der Fall. Ebenso reagierten die TRPM3-exprimierenden Zellen auch in Anwesenheit der jeweiligen Substanz unverändert auf die Applikation von monovalentfreier 10-mM-kalziumhaltiger Lösung mit einem starken Anstieg des Fura-2-Signals (Abbildung 2-1c, graue Balken). Folglich wurde die Aktivität der TRPM3-Kanäle nicht durch diese Substanzen inhibiert. Cannabinoide sind eine Gruppe strukturell verwandter neuroaktiver Substanzen, die an



**Abbildung 2-1: L-Aminosäuren sowie diverse Neurotransmitter und Cannabinoide beeinflussen die Aktivität von TRPM3-Kanälen nicht.**

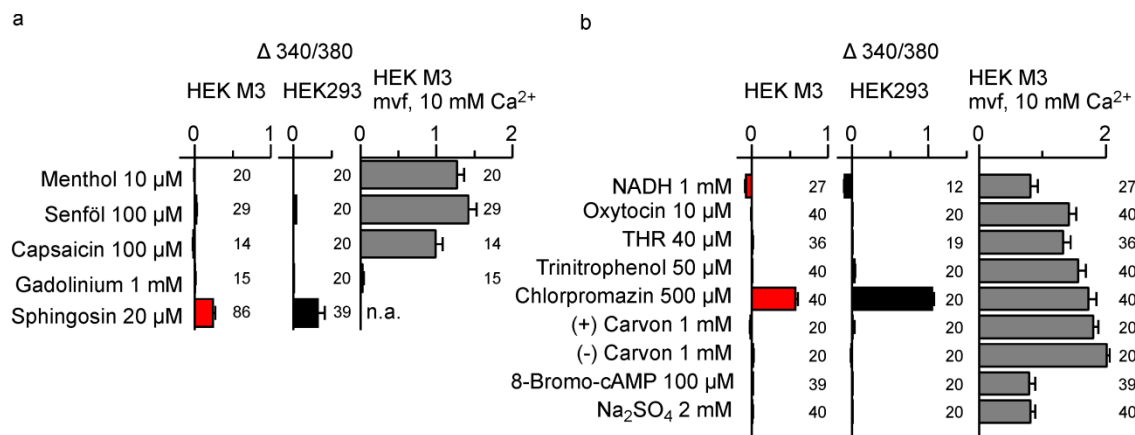
(a) Verlauf des Fura-2-Signals von 20 mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen (rot) und 17 nicht transfizierten Kontrollzellen (schwarz). Dopamin und monovalentfreie 10-mM-kalziumhaltige Badlösung wurden wie angegeben appliziert. (b-d) Statistische Auswertung von Experimenten die wie in a durchgeführt wurden. Anstelle von Dopamin wurde die jeweils angegebene Substanz appliziert (in b war die Konzentration stets 1 mM). Rote Balken zeigen die Änderung des Fura-2-Signals zwischen den in a gezeigten Punkten 1 und 2 für TRPM3-exprimierende Zellen während schwarze Balken diese Änderung des Fura-2-Signals von Kontrollzellen zeigen. Graue Balken repräsentieren die Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-transfizierten HEK-293 Zellen zwischen den in a dargestellten Punkten 1 und 3. Zahlen neben den Balken repräsentieren die Anzahl der gemessenen Zellen. In b sind Experimente mit L-Aminosäuren zusammengefasst, während in c Neurotransmitter und in d Cannabinoide untersucht wurden.

Cannabinoidrezeptoren im Gehirn binden und so ihre Wirkung entfalten. Für einige dieser Substanzen wurde zusätzlich auch beschrieben, dass sie an TRP-Kanälen wirken [49]. Daher lag es nahe, auch die Wirkung einiger Cannabi-

noide auf TRPM3-Kanäle zu untersuchen. Änderungen des Fura-2-Signals bei Applikation des jeweiligen Cannabinoids in Badlösung waren zwischen TRPM3-exprimierenden (Abbildung 2-1d, rote Balken) und Kontrollzellen (Abbildung 2-1d, schwarze Balken) vergleichbar und daher nicht auf die Expression von TRPM3-Kanälen zurückzuführen. TRPM3-exprimierende Zellen zeigten bei Applikation der Testsubstanz in monovalentfreier 10-mM-kalziumhaltiger Lösung (Abbildung 2-1d, graue Balken) stets eine deutliche Zunahme des Fura-2-Signals. Unsere Ergebnisse zeigten also, dass heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle nicht spezifisch durch eines der getesteten Cannabinoide aktiviert oder inhibiert wurden.

Somit mussten wir feststellen, dass keine der neuroaktiven Substanzen, die wir getestet hatten, eine starke Wirkung auf die Aktivität von TRPM3-Kanälen besaß. Wir entschlossen uns daher, auch Substanzen anderer Gruppen und ihre Wirkung auf TRPM3-Kanäle zu untersuchen. Diese Experimente wurden ebenfalls wie in Abbildung 2-1a anhand von Dopamin gezeigt durchgeführt und wie bereits beschrieben statistisch ausgewertet.

Viele TRP-Kanäle sind ionotrope Rezeptoren, die durch bestimmte Substanzen aktiviert oder inhibiert werden können [7]. Da TRP-Kanäle untereinander strukturell ähnlich sind, testeten wir die Wirkung einiger dieser Substanzen auf die Aktivität von TRPM3-Kanälen. Es stellte sich heraus, dass keine dieser Substanzen, bei stabil mit TRPM3-transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 2-2a, rote Balken) einen höheren Anstieg des Fura-2-Signals auslöste als bei Kontrollzellen (Abbildung 2-2a, schwarze Balken). Erstaunlicherweise galt dies auch für D-erythro-Sphingosin, einer Substanz, die zuvor bereits als Agonist von humanen TRPM3-Kanälen beschrieben wurde [19]. Vielmehr wurden durch die Applikation dieser Substanz, große Kalziumsignale ausgelöst, die nicht auf die Expression von TRPM3-Kanälen zurückzuführen waren. Um zu verstehen, wie es zu diesen Signalen kam, wurden die Effekte von D-erythro-Sphingosin auf TRPM3-exprimierende Zellen und Kontrollzellen genauer untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente werden weiter unten in Abschnitt 2.3.3 separat dargestellt. Wie erwartet wurde die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden Zellen in monovalentfreier,



**Abbildung 2-2 Effekt weiterer Substanzen auf TRPM3.**

(a, b) Statistische Auswertung von Experimenten, die wie in Abbildung 2-1a durchgeführt wurden. Anstelle von Dopamin wurde die angegebene Konzentration der jeweiligen Substanz appliziert. Rote Balken zeigen die Änderung des Fura-2-Signals zwischen den in a gezeigten Punkten 1 und 2 für TRPM3-exprimierende Zellen, während schwarze Balken dies für Kontrollzellen tun. Graue Balken repräsentieren die Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-transfizierten HEK-293 Zellen zwischen den in Abbildung 2-1a dargestellten Punkten 1 und 3. Zahlen neben den Balken repräsentieren die Anzahl der gemessenen Zellen. a zeigt Experimente mit bekannten TRP-Kanalmodulatoren, b weitere Substanzen, die keiner speziellen Gruppe zugeordnet wurden.

10-mM-kalziumhaltiger Lösung durch Zugabe des trivalenten Kations Gadolinium unterdrückt. Gadolinium wurde bereits als Inhibitor von TRPM3-Kanälen beschrieben [17, 30]. Die anderen getesteten Substanzen dieser Gruppe, hatten keinen Einfluss auf die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration von stabil mit TRPM3 transfizierten Zellen in monovalentfreier, 10-mM-kalziumhaltiger Lösung und zeigten folglich keinerlei inhibitorische Wirkung auf TRPM3-Kanäle (Abbildung 2-2a, graue Balken). Für D-erythro-Sphingosin waren diese Datenpunkte nicht auswertbar, da die Experimente stets vorher abbrachen. Die Gründe hierfür werden weiter unten (Abschnitt 2.3.3) erläutert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auch die Wirkung einiger Substanzen auf TRPM3 getestet, die nicht in eine der zuvor genannten Klassen einzuordnen waren. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden in Abbildung 2-2b zusammengefasst. Wir konnten zeigen, dass keine dieser Substanzen in den ver-

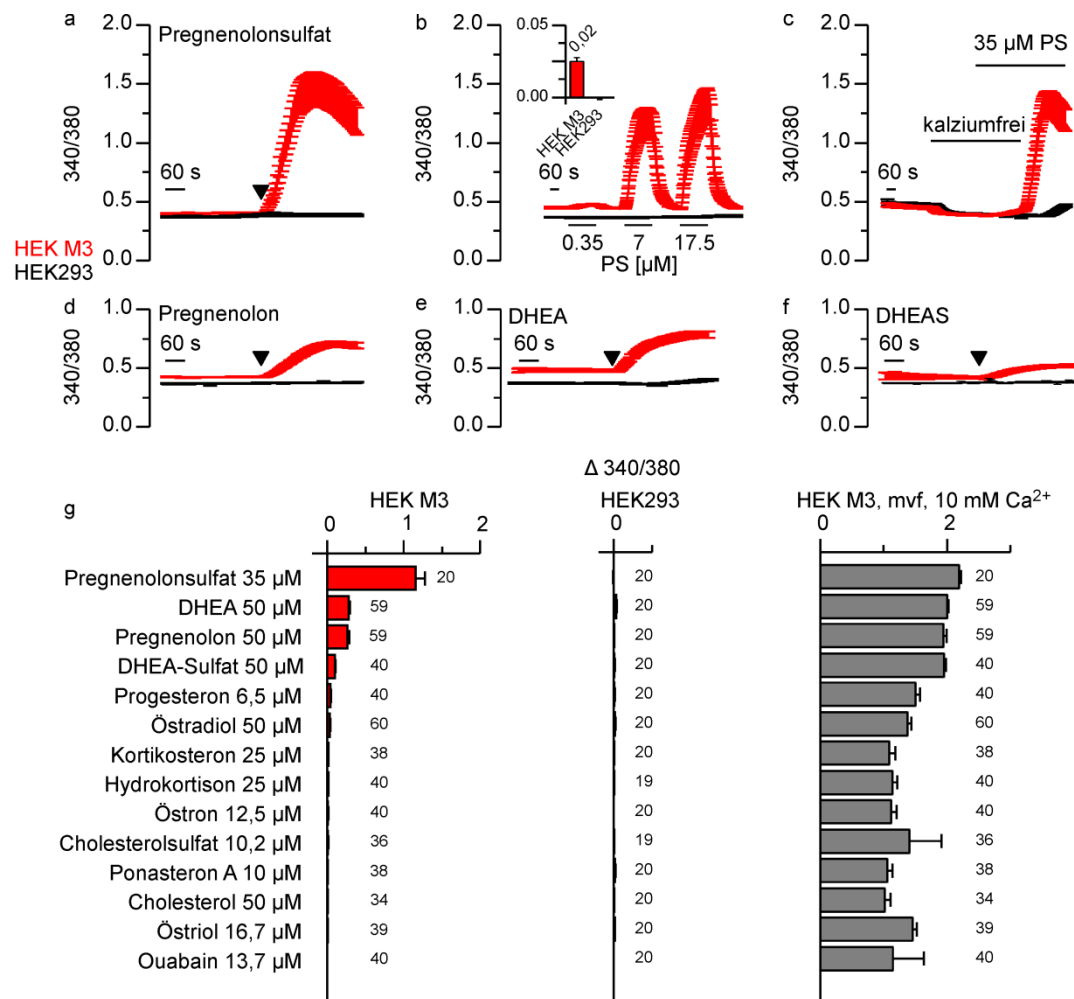


wendeten Konzentrationen die Aktivität von TRPM3 spezifisch verstärkte oder inhibierte. Die Applikation von 500  $\mu$ M Chlorpromazin führte zwar zu einem starken Anstieg des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden Zellen (Abbildung 2-2b, rote Balken), was aber bei Kontrollzellen (Abbildung 2-2b, schwarze Balken) ebenfalls beobachtet werden konnte. Folglich trat dieser Effekt unabhängig von der Expression von TRPM3-Kanälen auf.

Nachdem wir im Verlauf unserer anfänglichen Versuche mit neuroaktiven Substanzen kein Glück hatten, untersuchten wir die Wirkung von Neurosteroiden, einer weiteren Klasse neuroaktiver Substanzen, auf TRPM3.

Neurosteroiden sind Steroide, die direkt im Gehirn gebildet werden [50]. Einige dieser Substanzen modulieren neben ihrer klassischen Steroidwirkung, auch die Aktivität von Ionenkanälen [51]. Wir fanden, dass Pregnenolonsulfat einen starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden Zellen induzierte, während die Kalziumkonzentration von Kontrollzellen unverändert blieb. Abbildung 2-3a zeigt den Verlauf des Fura-2-Signals dieser Experimente von TRPM3-exprimierenden Zellen in rot gegenüber Kontrollzellen in schwarz während der Applikation von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat. Die Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumantwort der TRPM3-exprimierenden Zellen (Abbildung 2-3b, rote Spur) war schnell, dosisabhängig und völlig reversibel. Die statistische Auswertung dieser Messungen zeigte, dass bereits eine Konzentration von 350 nM Pregnenolonsulfat zu einer signifikanten Zunahme des Fura-2-Signals von TRPM3-transfizierten Zellen führte, während dies bei Kontrollzellen nicht der Fall war (Einsatz Abbildung 2-3b). In kalziumfreier Lösung konnten weder bei TRPM3-transfizierten (Abbildung 2-3c, rote Spur) noch bei Kontrollzellen (Abbildung 2-3c, schwarze Spur) Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignale gemessen werden. Erst als der Perfusionslösung wieder Kalzium zugesetzt wurde, stieg das Fura-2-Signal von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen an. Bei Kontrollzellen, die TRPM3 nicht exprimierten, blieb dieser Anstieg, wie man es bei einem TRPM3-vermittelten Signal erwarten würde, aus. Wir konnten somit zeigen, dass die Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignale durch einen Kalziumeinstrom durch TRPM3-Kanäle in der Plasmamembran und nicht durch eine Entleerung intrazellulärer Speicher zustande

kamen. Pregnenolonsulfat wird im Körper durch die Sulfatierung von Pregnenolon, welches wiederum direkt aus Cholesterol entsteht, gebildet [50]. Weitere strukturell sehr ähnliche Substanzen sind Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). Wir fanden, dass auch 50  $\mu$ M Pregnenolon durch die spezifische Aktivierung von TRPM3 zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führte (Abbildung 2-3d, rote Spur: TRPM3-exprimierende HEK293 Zellen), während die Kalziumkonzentration von Kontrollzellen nicht durch die Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolon verändert wurde (Abbildung 2-3d, schwarze Spur). Quantitativ war aber der Effekt von Pregnenolon deutlich kleiner als der von Pregnenolonsulfat. Dies ließ darauf schließen, dass die Sulfatgruppe für die Aktivierung von TRPM3 eine wichtige Rolle spielte. DHEA, welches im Körper direkt aus Pregnenolon gebildet wird, führte bei Fura-2 Experimenten zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden Zellen (Abbildung 2-3e, rote Spur), der bei Kontrollzellen (Abbildung 2-3e, schwarze Spur) ausblieb. Jedoch war die Wirkung von DHEA auf TRPM3 deutlich schwächer als die von Pregnenolonsulfat und quantitativ eher vergleichbar mit der von Pregnenolon. Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchten wir, ob auch DHEA-Sulfat (DHEAS), die sulfatierte Form von DHEA, TRPM3-Kanäle aktivierte und ob wie bei Pregnenolon die Sulfatierung zu einer deutlich stärkeren Aktivierung führt. Es zeigte sich, dass auch DHEAS TRPM3-Kanäle aktivierte, jedoch nur in einem Ausmaß wie bereits vorher bei DHEA und Pregnenolon beobachtet wurde (Abbildung 2-3f). Dies ließ darauf schließen, dass neben der Sulfatgruppe auch die Strukturunterschiede von Pregnenolon und DHEA am D-Ring die Aktivierung von TRPM3 durch diese Substanzen beeinflussten. Nach der Identifizierung dieser vier sehr ähnlichen Substanzen als Agonisten von TRPM3, stellten wir uns die Frage, ob auch Steroide mit größeren Strukturunterschieden zu Pregnenolonsulfat, TRPM3-Kanäle aktivierten. Wir testeten daher die Wirkung weiterer Steroide auf die Aktivität von TRPM3. Hierfür wurden fluorometrische Kalziummessungen durchgeführt, in denen die Lösungen und Substanzen wie bereits in Abbildung 2-1a für Dopamin dargestellt wurde, appliziert wurden. Aus diesen Versuchen wurden die durch die jeweilige Substanz ausgelösten Änderungen



**Abbildung 2-3 TRPM3-Kanäle werden durch Pregnenolonsulfat aktiviert.**

(a-f) Fura-2-Signal von TRPM3-transfizierten HEK293 Zellen (rot) und Kontrollzellen (schwarz).  $n > 20$  für jeden Datenpunkt in diesen Abbildungen. (a) Der Pfeil zeigt die Zugabe von 35 µM Pregnenolonsulfat (PS). (b) Die Applikation von Pregnenolonsulfat in verschiedenen Konzentrationen wird durch die verschiedenen Balken angezeigt. Der Einsatz zeigt die statistische Analyse der durch 350 nM ausgelösten Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen (roter Balken,  $p$ -Wert=0,02) und Kontrollzellen (schwarzer Balken, nicht signifikant). (c) Nominal kalziumfreie Lösung und Pregnenolonsulfat wurden wie angegeben appliziert. (d-f) Strukturell zu Pregnenolonsulfat ähnliche Steroide aktivierten ebenfalls TRPM3-Kanäle. Die Pfeile zeigen die Applikation von Pregnenolon (d), DHEA (e) und DHEAS (f) in einer Konzentration von 50 µM. (g) Statistische Auswertung von Experimenten die wie in Abbildung 2-1a durchgeführt wurden. Anstelle von Dopamin wurde die angegebene Konzentration der jeweils angegeben Substanz appliziert. Rote Balken zeigen die Änderung des Fura-2-Signals zwischen den in Abbildung 2-1a gezeigten Punkten 1 und 2 für TRPM3-exprimierende Zellen und schwarze Balken von Kontrollzellen. Graue Balken repräsentieren die Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-transfizierten HEK-293 Zellen zwischen

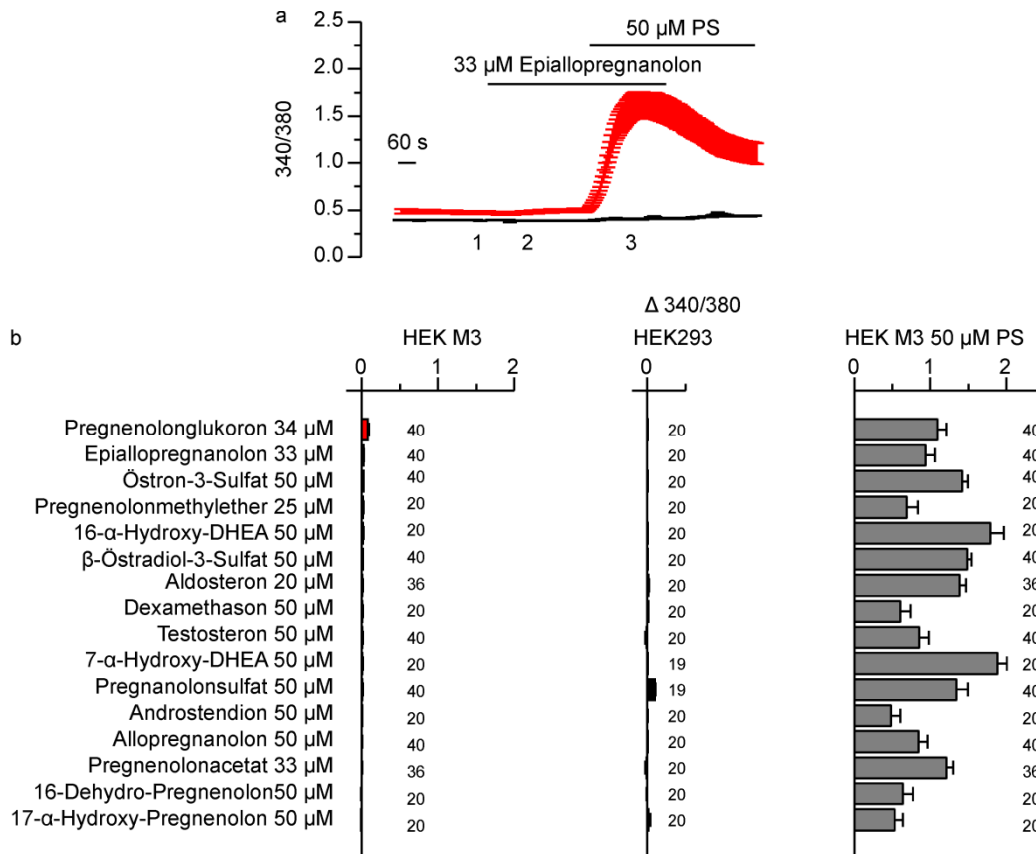
den in Abbildung 2-1a dargestellten Punkten 1 und 3. Zahlen neben den Balken repräsentieren die Anzahl der gemessenen Zellen.

---

des Fura-2-Signals von TRPM3-transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 2-3g, rote Balken) und Kontrollzellen (Abbildung 2-3g, schwarze Balken) berechnet. Wie bereits zuvor (Abbildung 2-1) wurde die Änderung des Fura-2-Signals zwischen Punkt 1 und 2 als Maß für die Aktivierung von TRPM3 durch eine Substanz genommen. Keine der in diesen Experimenten getesteten Steroide führte in der verwendeten Konzentration zu einem auf die Aktivierung von TRPM3 zurückzuführenden Anstieg des Fura-2-Signals. Ebenso konnte die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen in monovalentfreier 10-mM-kalziumhaltiger Lösung (Abbildung 2-3f, graue Balken) durch keines der getesteten Steroide vollständig unterdrückt werden. Folglich inhibierte keines der auf diese Weise getesteten Steroide TRPM3-Kanäle deutlich.

Mit einer Reihe weiterer Steroide führten wir sehr ähnliche Experimente durch. Der einzige Unterschied war, dass im Perfusionsprotokoll anstatt der monovalentfreien 10-mM-kalziumhaltigen Lösung eine Badlösung mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat zur Aktivierung von TRPM3 verwendet wurde. Abbildung 2-4a zeigt den Verlauf eines solchen Experiments anhand von Epiallopregnanolon. Ausgewertet wurde die in Badlösung durch die jeweilige Substanz ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals ( $\Delta$  340 / 380 zwischen den Punkten 1 und 2) für die Aktivierung von TRPM3 (Abbildung 2-4b, rote Balken: TRPM3-exprimierende HEK293 Zellen, schwarze Balken: Kontrollzellen) und die Inhibition der, diesmal durch 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat induzierten, Aktivierung von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 2-4b, graue Balken:  $\Delta$  340 / 380 zwischen den Punkten 3 und 1 in Abbildung 2-4a). Für keine der so getesteten Steroide wurde eine TRPM3-aktivierende Wirkung festgestellt. Ebenso wenig wurde der durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden Zellen durch eine dieser Substanzen stark unterdrückt. Folglich inhibierte keine dieser Substanzen TRPM3 vollständig.

In den bisher durchgeführten Experimenten, wurden die Steroide häufig in sehr unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Um aber vergleichbare Aussagen darüber zu machen, welches Steroid TRPM3 im Vergleich mit den anderen Steroiden wie gut aktivierte, wurde die Wirkung einiger wichtiger Steroide in einer weiteren Reihe von Versuchen untersucht. Dabei wurde jede Substanz in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  verwendet (Ausnahme Ouabain 500  $\mu\text{M}$ ). Das grundsätzliche experimentelle Design dieser Versuche wurde in Abbildung 2-5a anhand von Progesteron dargestellt. In Abbildung 2-5b wurden die Ergebnisse dieser Versuche als Balkendiagramme zusammengefasst. Die roten Balken repräsentieren dabei stets die Änderung des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3-transfizierten HEK293 Zellen, die durch die Applikation der Testsubstanz hervorgerufen wurde. Die grauen Balken zeigen die durch die Applikation von 50  $\mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat ausgelöste Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen im gleichen Experiment. Die schwarzen Balken zeigen die durch die Testsubstanz ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals nicht transfizierter HEK293 Zellen. Wir konnten die zuvor erhaltenen Ergebnisse für Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, DHEA und DHEAS in diesen Experimenten bestätigen. Zudem konnten wir mit Pregnenolonhemisuccinat ein weiteres, zuvor noch nicht getestetes Steroid identifizieren, das TRPM3-Kanäle aktivierte. Dabei war Pregnenolonhemisuccinat als TRPM3-Agonist zwar deutlich potenter als Pregnenolon, DHEA und DHEAS aber auch deutlich schwächer als Pregnenolonsulfat. Dazu kam, dass Pregnenolonhemisuccinat auch bei Kontrollexperimenten mit nicht transfizierten HEK293 Zellen einen kleinen Anstieg des Fura-2-Signals auslöste. Die Effekte von Pregnenolonhemisuccinat waren also nicht ausschließlich auf die Aktivierung von TRPM3-Kanälen zurückzuführen. Somit blieb Pregnenolonsulfat von allen getesteten Steroiden das mit der stärksten aktivierenden Wirkung auf TRPM3-Kanäle. Weiterhin zeigten unsere Ergebnisse, dass bereits kleinste Unterschiede in der Steroidstruktur darüber entschieden, ob TRPM3-Kanäle durch ein bestimmtes Steroid aktiviert werden oder nicht. Somit eignet sich Pregnenolonsulfat sehr gut als pharmakologisches Werkzeug für die zukünftige Identifizierung und Charakterisierung endogener TRPM3-Kanäle.



**Abbildung 2-4 Bereits kleine Änderungen der Steroidstruktur führen dazu, dass TRPM3-Kanäle nicht mehr aktiviert werden.**

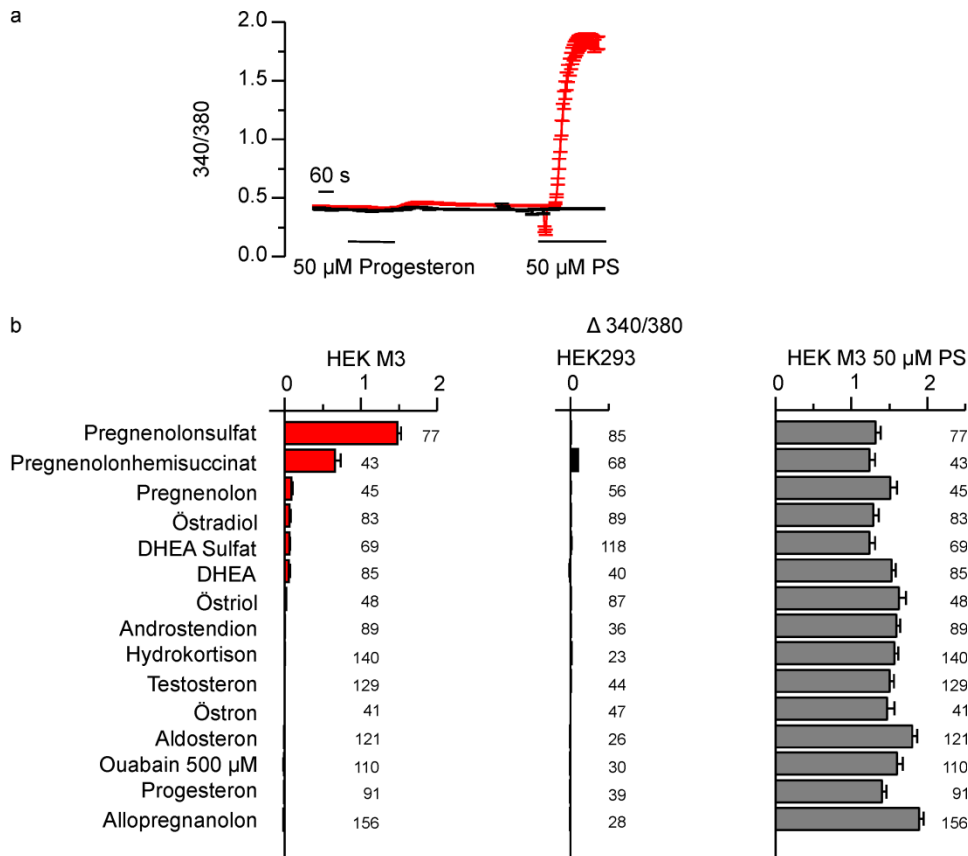
(a) Verlauf des Fura-2-Signals von 40 stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen (rot) und 20 Kontrollzellen (schwarz) 33 µM Epiallopregnanolon und 50 µM Pregnenolonsulfat (PS) wurden der Perfusionslösung wie angegeben zugegeben. (b) Statistische Auswertung des Fura-2-Signals von Experimenten, bei denen die jeweilige Testsubstanz anstelle von Epiallopregnanolon wie in a gezeigt appliziert wurde. Rote Balken zeigen die Änderung des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen zwischen den in a gezeigten Zeitpunkten 1 und 2, während schwarze Balken die korrespondierenden Werte von Experimenten mit Kontrollzellen zeigen. Graue Balken zeigen die Änderung des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen zwischen den in a gezeigten Zeitpunkten 1 und 3. Die Zahlen neben den Balken zeigen die Anzahl der ausgewerteten Zellen.

Nachdem wir mit Pregnenolonsulfat einen spezifischen und potenten Agonisten von TRPM3-Kanälen identifizieren konnten, fokussierten wir uns im weiteren Verlauf der Arbeit auf Substanzen, die als Blocker von TRPM3-Kanalproteinen in Frage kamen. Bisher wurde nur gezeigt, dass das Lanthanoid Gadolinium eine inhibitorische Wirkung auf TRPM3-Kanäle besitzt [17, 30], was auch in un-

seren Experimenten reproduziert werden konnte (Abbildung 2-2a). Gadolinium inhibiert aber auch andere Ionenkanäle darunter eine ganze Reihe von TRP-Kanälen [7]. Zudem aktiviert es TRPC4- und TRPC5-Kanäle [52]. Als pharmakologisches Mittel zur Charakterisierung endogen exprimierter TRPM3-Kanalproteine ist Gadolinium daher eher ungeeignet. Wir untersuchten deshalb mit fluorometrischen Kalziummessungen die Wirkung von Blockern spannungsabhängiger Kalziumkanäle auf TRPM3-Kanäle. Völlig unerwartet führte bei diesen Messungen die Applikation von Nifedipin, dem prototypischen Dihydropyridin, zu einem Anstieg des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen (Abbildung 2-6a, rote Spur). Bereits die Applikation von Nifedipin in einer Konzentration von 3,5  $\mu\text{M}$  führte bei diesen Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Kontrollzellen (Abbildung 2-6a, schwarze Spur) reagierten auf die verwendeten Konzentrationen von Nifedipin immer deutlich schwächer als TRPM3-transfizierte HEK293 Zellen.

Nifedipin ist nicht photostabil und wird durch ultraviolettes Licht photochemisch abgebaut [53]. Auch wenn alle Nifedipinlösungen immer frisch angesetzt und vom Licht abgeschirmt wurden, war es nicht auszuschließen, dass auch in der von uns verwendeten Nifedipinlösung solche photochemischen Abbauprodukte enthalten waren. Um auszuschließen, dass eines dieser Abbauprodukte und nicht Nifedipin selbst TRPM3-Kanäle aktivierte, wurden Experimente mit photoinaktiviertem Nifedipin (Nifedipin p.i.) durchgeführt. Hierzu wurde die Nifedipinstocklösung (50 mM Nifedipin in DMSO) 15 Minuten mit einer UV-Lampe (Uvico, Rapp Opto) bestrahlt.

Die in Abbildung 2-6b dargestellten Kalziummessungen zeigten, dass nach Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  Nifedipin der Wechsel auf 50  $\mu\text{M}$  photoinaktiviertes Nifedipin zu einem starken Rückgang des Fura-2-Signals von TRPM3-transfizierten Zellen führte. Wurde anschließend wieder auf 50  $\mu\text{M}$  Nifedipin gewechselt, stieg das Signal wieder auf das Niveau, dass bereits vor dem Wechsel auf photoinaktiviertes Nifedipin erreicht wurde. Ebenso führte die alleinige Applikation von photoinaktiviertem Nifedipin nicht zu einer Erhöhung des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 2-6c). Erst auf die Koapplikation von Nifedipin reagierten die Zellen mit einer Erhöhung der



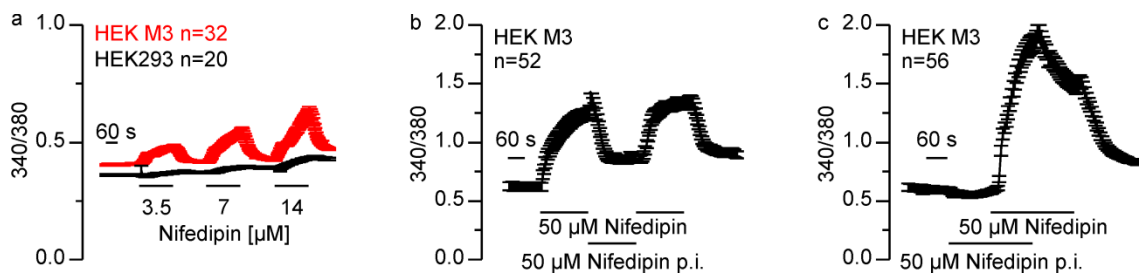
**Abbildung 2-5 Von allen getesteten Steroiden aktivierte Pregnenolonsulfat TRPM3-Kanäle am stärksten.**

(a) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von 91 stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen (rot) und 39 HEK293 Zellen (schwarz). Progesteron und Pregnenolonsulfat (PS) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten in einer Konzentration von 50 µM der Perfusionslösung zugegeben.

(b) Statistische Auswertung von Experimenten, die wie in a gezeigt durchgeführt wurden. Anstelle von Progesteron wurden 50 µM der angegebenen Substanz (Ausnahme: Ouabain 500 µM) appliziert. Die mittlere Änderung des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen nach zweiminütiger Applikation der Testsubstanz wurde in rot, die von Kontrollzellen in schwarz dargestellt. Die grauen Balken repräsentieren die Änderung des Fura-2-Signals der TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen, die durch die spätere Zugabe von 50 µM Pregnenolonsulfat ausgelöst wurde. Die Zahlen neben den Balken zeigen stets die Anzahl der ausgewerteten Zellen.

intrazellulären Kalziumkonzentration. Beide Experimente deuteten darauf hin, dass TRPM3 durch Nifedipin und nicht durch eines seiner photochemischen Abbauprodukte aktiviert wurde. Wir konnten also mit Nifedipin einen weiteren Agonisten von TRPM3 identifizieren. Wir testeten mit Fura-2 Kalziummessugen



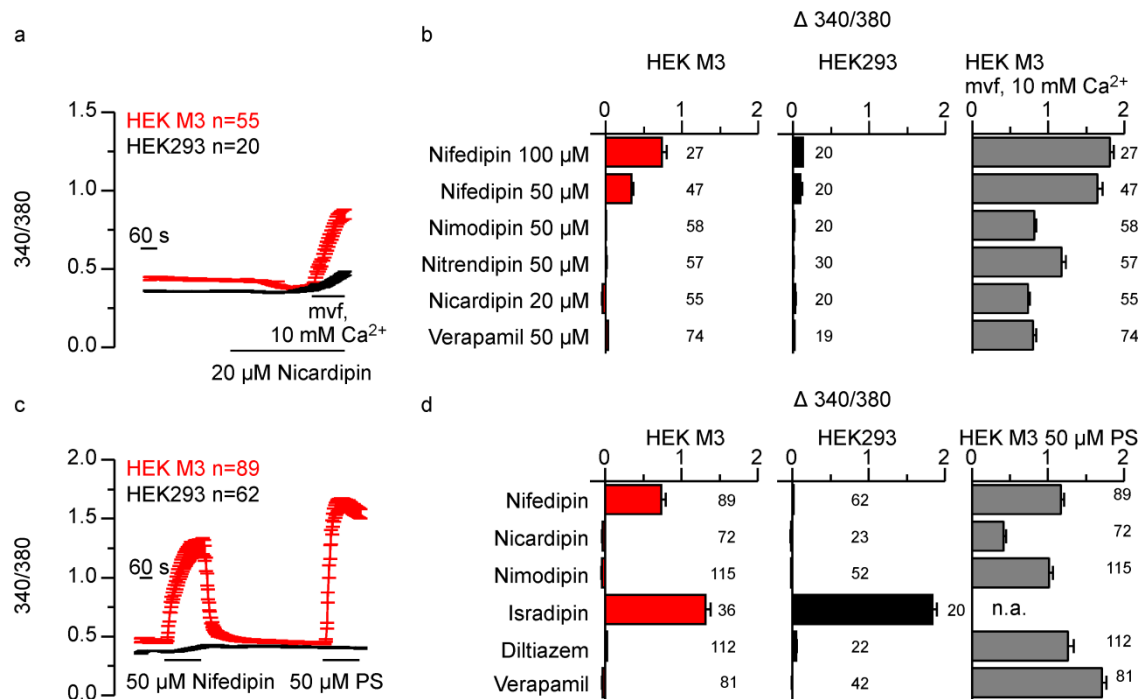


**Abbildung 2-6 TRPM3 wird durch Nifedipin aktiviert.**

(a) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von 32 stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen (rot) und 20 Kontrollzellen (schwarz). Badlösung mit Nifedipin in den verschiedenen Konzentrationen wurde wie angegeben appliziert. (b, c) Kalziummessungen mit Fura-2 von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen. 50 µM Nifedipin und 50 µM photoinaktiviertes Nifedipin (Nifedipin p.i.) wurden zu den eingezeichneten Zeiten der Perfusionslösung zugegeben. Die Anzahl der jeweils gemessenen Zellen ist in der Abbildung vermerkt.

---

eine Reihe weiterer Kalziumkanalblocker darauf, ob sie TRPM3-Kanäle in ihrer Aktivität beeinflussen. Abbildung 2-7a zeigt am Beispiel von Nicardipin den Ablauf dieser Experimente. Sie entsprechen im experimentellen Design den in Abbildung 2-1 dargestellten Versuchen und wurden daher auch statistisch wie diese ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 2-7b zusammengefasst. Die roten Balken repräsentieren die durch die getestete Substanz in Badlösung ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen während schwarze Balken die Ergebnisse der äquivalenten Experimente mit Kontrollzellen zusammenfassen. Wir konnten deutlich zeigen, dass bei diesen Experimenten außer Nifedipin keines der getesteten Dihydropyridine, ebenso wenig wie Verapamil (ein Kalziumkanalblocker aus der Klasse der Phenylalkylamine) TRPM3-Kanäle aktivierte. Während Nifedipin wie erwartet den Anstieg der monovalentfreier 10-mM-kalziumhaltiger Lösung verstärkte, hatten die übrigen getesteten Substanzen auch unter diesen Bedingungen keinen starken Effekt auf die Aktivität von TRPM3 (Abbildung 2-7b, graue Balken). Um die Wirkungen der Kalziumkanalblocker untereinander auch quantitativ vergleichen zu können, führten wir weitere Experimente durch, bei denen wir die getestete Substanz stets in einer Konzentration von 50 µM verwendeten. Diese Versuche wurden immer wie in Abbildung 2-7c am Beispiel von Nifedipin



**Abbildung 2-7 Keins der getesteten Dihydropyridine inhibierte TRPM3-Kanäle vollständig.**

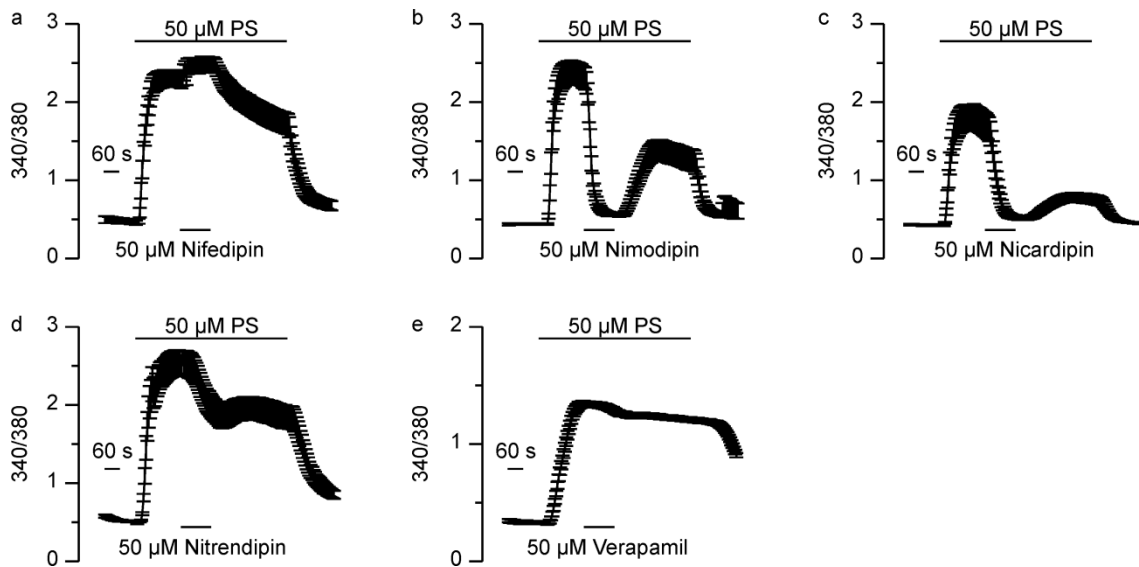
(a, c) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen (rot) und Kontrollzellen (schwarz). (a) 20 µM Nicardipin und monovalentfreie, 10-mM-kalziumhaltige Lösung wurden wie angegeben appliziert. (b) Statistische Auswertung von Experimenten, die wie in a gezeigt, die mit Nicardipin oder der jeweils angegebenen Testsubstanz, durchgeführt wurden. Rote Balken repräsentieren die durch die Testsubstanz ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden Zellen, schwarze Balken die von Kontrollzellen. Graue Balken zeigen die Änderung des Fura-2-Signals bei Applikation der Testsubstanz in monovalentfreier, 10-mM-kalziumhaltiger Lösung gegenüber dem Fura-2-Signal in Standardlösung. (c) 50 µM Nifedipin und 50 µM Pregnenolonsulfat wurden wie angegeben der Perfusionslösung zugegeben. (d) Statistische Auswertung von Experimenten, die wie in c durchgeführt wurden. Nifedipin oder die jeweilige Testsubstanz wurde in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt. Rote Balken zeigen die durch die Testsubstanz hervorgerufene Änderung des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden Zellen, schwarze Balken die von Kontrollzellen. Die grauen Balken zeigen die durch 50 µM Pregnenolonsulfat ausgelöste Zunahme des Fura-2-Signals der TRPM3-exprimierenden Zellen. (b, d) Die Zahlen neben den Balken zeigen stets die Anzahl der gemessenen Zellen.

dargestellt durchgeführt und in Abbildung 2-7d für die einzelnen Substanzen statistisch ausgewertet. Die roten Balken zeigen die durch Zugabe der jeweiligen Testsubstanz in einer Konzentration von 50 µM ausgelöste Änderung des

Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen, während die schwarzen Balken dies für Experimente mit nicht transfizierten HEK293 Zellen tun. Die Ergebnisse bestätigten, dass neben Nifedipin keiner der untersuchten Kalziumkanalblocker TRPM3-Kanäle spezifisch aktivierte. Die Applikation von Isradipin führte während dieser Experimente zwar zu einem Anstieg des Fura-2-Signals, jedoch war dies unabhängig von der Expression von TRPM3-Kanälen auch bei Kontrollzellen zu beobachten. Die anschließende Stimulation der TRPM3-exprimierenden Zellen mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat diente als Positivkontrolle für funktionelle TRPM3-Kanäle. Die dadurch ausgelöste mittlere Änderung des Fura-2-Signals wurde in den grauen Balken dargestellt (Abbildung 2-7d) und war bei allen Experimenten deutlich (für Isradipin konnten diese Experimente, aufgrund der großen, von der Expression von TRPM3-Kanälen unabhängigen Effekte, nicht ausgewertet werden). Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das Dihydropyridin Nifedipin heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle stark aktivierte. Alle sonst getesteten Inhibitoren spannungsabhängiger Kalziumkanäle hatten in unseren Versuchen weder einen aktivierenden noch einen stark inhibierenden Effekt auf die Aktivität von TRPM3.

### **2.3.2 Koapplikationsversuche**

Auch wenn keiner der getesteten Kalziumkanalblocker die Aktivität von TRPM3-Kanälen stark inhibierte, so war das Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignal bei den in Abbildung 2-7d dargestellten Experimenten speziell nach Applikation von Nicardipin reduziert, obwohl zum Zeitpunkt der Zugabe von Pregnenolonsulfat die Applikation von Nicardipin schon lange beendet war. Wir stellten uns die Frage, ob das durch Pregnenolonsulfat oder Nifedipin ausgelöste Kalziumsignal von TRPM3-exprimierenden Zellen durch die Koapplikation eines Kalziumkanalblockers beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Versuche konzentrierten wir uns zuerst auf die Frage, inwiefern Nifedipin und andere Dihydropyridine sowie Verapamil die Aktivierung von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat beeinflussen. Fura-2-geladene TRPM3-exprimierende HEK293 Zellen wurden hierzu mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat stimuliert bis das Fura-2-Signal der Zellen ein stabiles Niveau erreicht hatte. Daraufhin wurde zusätzlich eines der



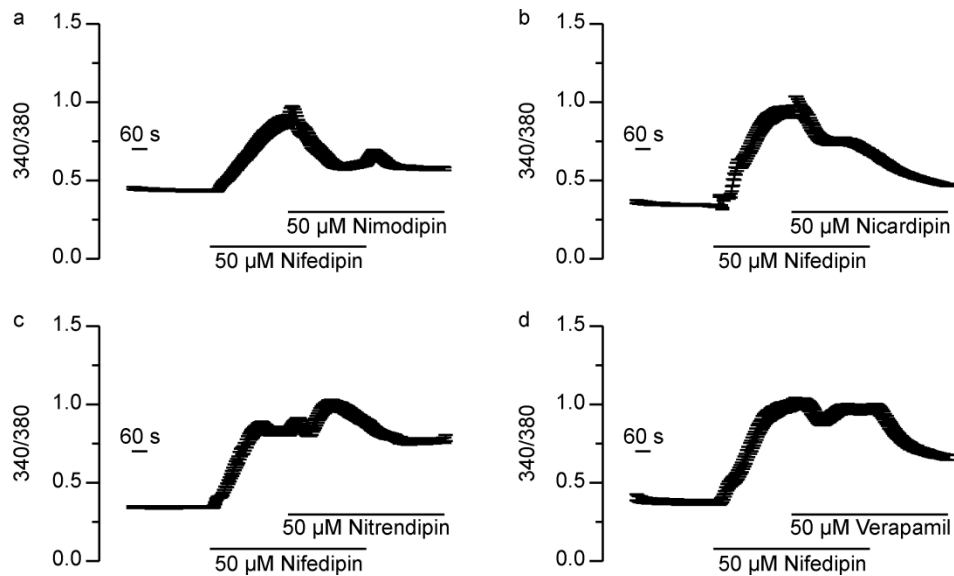
**Abbildung 2-8 Nimodipin und Nicardipin hemmen die Aktivierung von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat während sie durch Nifedipin verstärkt wird.**

(a-e) Messungen des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen.  $n > 20$  für alle Datenpunkte in dieser Abbildung. Die Zellen wurden mit 50 µM Pregnenolonsulfat (PS) aktiviert und nach dem Erreichen eines stabilen Fura-2-Signals zusätzlich Nifedipin (a), Nimodipin (b), Nicardipin (c), Nitrendipin (d) oder Verapamil (e) in einer Konzentration von 50 µM zugegeben.

---

Dihydropyridine oder Verapamil koappliziert. Wie zu erwarten, führte die Koapplikation von Pregnenolonsulfat und Nifedipin zu einer weiteren Erhöhung des Fura-2-Signals und folglich der intrazellulären Kalziumkonzentration der stabil mit TRPM3 transfizierten Zellen (Abbildung 2-8a). Interessanterweise reduzierten Nicardipin (Abbildung 2-8b) und Nimodipin (Abbildung 2-8c) das Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignal auf nahezu das Niveau, welches die Zellen unter Ruhebedingungen besaßen. Dies war deshalb unerwartet, da diese Substanzen zuvor keinen großen Einfluss auf den Anstieg des Fura-2-Signals von TRPM3-exprimierenden Zellen in monovalentfreier, 10-mM-kalziumhaltiger Lösung hatten (Abbildung 2-7a, b). Die Kalziumkonzentration der Zellen nahm nach Wegnahme von Nimodipin deutlich stärker und auch schneller wieder zu, als nach der Entfernung von Nicardipin aus der Perfusionslösung. In beiden Fällen war der inhibitorische Effekt aber nur teilweise reversibel. Nitrendipin dagegen führte in vergleichbaren Experimenten nur zu einer sehr schwachen Reduktion des Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignals (Abbildung 2-8d).

---



**Abbildung 2-9 Nimodipin und Nicardipin hemmen die Aktivierung von TRPM3 durch Nifedipin.**

(a-d) Fluorometrische Messungen des Fura-2-Signals von stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen.  $n > 20$  für jeden Datenpunkt in dieser Abbildung. Nimodipin (a), Nicardipin (b), Nitrendipin (c) oder Verapamil (d) wurden jeweils in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in der angegebenen Art und Weise zu mit 50  $\mu\text{M}$  Nifedipin stimulierten Zellen koappliziert.

---

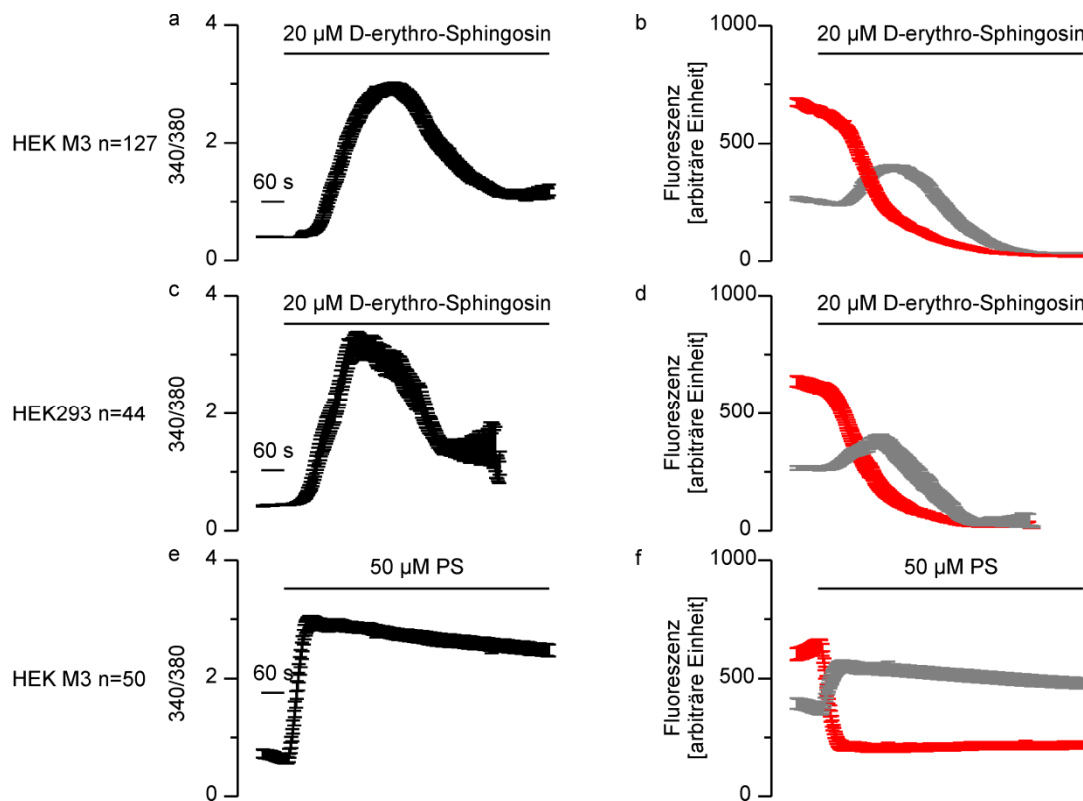
Wie aus Abbildung 2-8e ersichtlich wird, führte die Zugabe von Verapamil während diesen Experimenten zu keiner Änderung des Fura-2-Signals von mit Pregnenolonsulfat aktivierten TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen. Folglich hatte Verapamil keinerlei Einfluss auf die Pregnenolonsulfat-induzierte TRPM3-Kanalaktivität.

In ähnlichen Versuchen wurde auch getestet, inwiefern Verapamil und die getesteten Dihydropyridine, die durch Nifedipin hervorgerufene Aktivierung von TRPM3 beeinflussen. Hierzu wurden TRPM3-exprimierende HEK293 Zellen zuerst mit 50  $\mu\text{M}$  Nifedipin aktiviert und dann der Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Koapplikation der jeweils getesteten Substanz anhand des Fura-2-Signals der Zellen fluorometrisch verfolgt. Während die Applikation von Nimodipin (Abbildung 2-9a) und Nicardipin (Abbildung 2-9b) das Fura-2-Signal von mit Nifedipin aktivierten, TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen deutlich reduzierten, führte die Applikation von Nitrendipin (Abbildung 2-9c) zu einer weiteren Erhöhung des Kalziumsignals der Zellen. Verapamil

dagegen hatte wie schon zuvor für die Aktivierung mit Pregnenolonsulfat beobachtet keinen Einfluss auf die Kalziumkonzentration von mit Nifedipin aktivierten TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen (Abbildung 2-9d). Nicardipin und Nimodipin wurden somit als Blocker der Pregnenolonsulfat- und Nifedipin-induzierten Aktivierung von TRPM3-Kanalproteinen identifiziert. Nitrendipin dagegen inhibierte die Aktivierung von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat sehr schwach, verstärkte aber die Aktivierung durch Nifedipin. Nitrendipin scheint daher die Aktivität von TRPM3-Kanälen zu modulieren ohne den Kanal direkt zu aktivieren. Keine der getesteten Kalziumkanalblocker unterdrückte die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration von TRPM3-exprimierenden Zellen in monovalentfreier 10-mM-kalziumhaltiger Lösung vollständig (Abbildung 2-7a, b). Folglich inhibierte keine dieser Substanzen die konstitutive Aktivität von TRPM3-Kanälen vollständig. Verapamil war von allen getesteten Kalziumkanalblockern die einzige Substanz, die unter den gegebenen Umständen keinerlei Wirkung auf TRPM3-Kanäle hatte und auch keine von der Expression von TRPM3 unabhängigen Kalziumsignale auslöste.

### **2.3.3 D-erythro-Sphingosin**

Wie bereits in Abschnitt 2.3.1 gezeigt wurde, führte während unseren Experimenten die Applikation von D-erythro-Sphingosin unabhängig von der Expression von TRPM3 zu großen Kalziumsignalen. Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu bereits von anderen veröffentlichten Ergebnissen standen [19], wollten wir feststellen, auf welche Art und Weise es zu diesen großen Kalziumsignalen kam. Wir führten deshalb weitergehende Kalziummessungen und Analysen durch, deren Ergebnisse in Abbildung 2-10 zusammengefasst wurden. In diesen Experimenten reagierten TRPM3-exprimierende Zellen (Abbildung 2-10a) erst mehr als eine Minute nach Beginn der Applikation von 20  $\mu$ M D-erythro-Sphingosin mit einem sehr starken Anstieg des Fura-2-Signals. Dieser Effekt konnte jedoch auch bei Kontrollzellen (Abbildung 2-10c) beobachtet werden und war deshalb, zumindest zu einem Großteil, nicht auf eine Aktivierung von TRPM3-Kanälen zurückzuführen. Im weiteren Verlauf der Experimente fiel dann das zuerst sehr hohe Fura-2-Signal auf einen Wert von



**Abbildung 2-10 Die Applikation von D-erythro-Sphingosin, nicht aber von Pregnenolonsulfat, führt zum Verlust der Fura-2 Fluoreszenz**

(a) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von HEK293 Zellen, die stabil TRPM3-Kanäle exprimieren. 20  $\mu$ M D-erythro-Sphingosin wurde wie gezeigt appliziert. (b) Absolute Fluoreszenzintensitäten für die Anregung mit Licht von 340 nm (grau) und 380 nm (rot) korrespondierend zu den in a gezeigten Experimenten. (c) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von Experimenten mit nicht transfizierten Kontrollzellen. (d) Absolute Fluoreszenzintensitäten für die Anregung mit Licht von 340 nm (grau) und 380 nm (rot) korrespondierend zu den in c gezeigten Experimenten. (e) Gleiche Experimente wie in a aber mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat (PS) anstelle von 20  $\mu$ M D-erythro-Sphingosin. (f) Verlauf der absoluten Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm (grau) und 380 nm (rot) Anregungswellenlänge der in e dargestellten Versuche. (a-f) Die angegebene Zellzahl in diesen Experimenten ist die Anzahl der Zellen zu Beginn jedes Experiments.

ungefähr eins ab. Viele der Zellen wurden dabei am Ende des Experiments von der automatischen Auswertroutine nicht mehr detektiert. Dies geschieht nur, wenn die Fluoreszenzintensität des Fura-2 Farbstoffes nach Anregung nur wenig größer ist als der Wert für die Hintergrundfluoreszenz (siehe Abschnitt 2.2.2). Diese ungewöhnliche Beobachtung brachte uns dazu, auch den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten bei den beiden Anregungswellenlängen 340 nm

und 380 nm, aus denen sich das Fura-2-Signal berechnete, näher zu betrachten. In Abbildung 2-10b wurde der Verlauf der Fluoreszenzintensität von mit Fura-2 geladenen, stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen bei Anregung mit Licht von 340 nm (graue Spur) und 380 nm (rote Spur) der in Abbildung 2-10a gezeigten Experimente aufgetragen. Wurde D-erythro-Sphingosin über einen Zeitraum von mehr als 5 Minuten appliziert, kam es zu einer starken Abnahme der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit Licht von 340 nm beziehungsweise 380 nm Wellenlänge. Diese Abnahme überstieg die durch das Bleichen des Farbstoffes bedingte Abnahme der Fluoreszenzintensität, wie sie vor der Zugabe von D-erythro-Sphingosin verfolgt werden konnte, bei weitem. Diese Experimente wurden mit vergleichbaren Ergebnissen auch mit HEK293 Zellen durchgeführt (Abbildung 2-10c, d). Wieder kam es zu der starken Abnahme der Fluoreszenzintensität bei beiden Anregungswellenlängen. Ein Verlauf des Fura-2-Signals und auch der Fluoreszenzintensitäten, wie wir ihn stets bei der Applikation von 20  $\mu$ M D-erythro-Sphingosin beobachteten, wurde während der Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat über den gleichen Zeitraum nie beobachtet (Abbildung 2-10e,f). Unsere Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass D-erythro-Sphingosin die Integrität der Zellmembran zerstörte, was zu einem starken Anstieg des Kalziumsignals führte. Im weiteren Verlauf führte die Zerstörung der Zellmembran zum Auswaschen des Fura-2-Farbstoffes, was die Abnahme der Fluoreszenzintensität erklärt. Es ist nicht davon auszugehen, dass eine längere Applikation von D-erythro-Sphingosin in den hier verwendeten Konzentrationen möglich ist, ohne die Zelle zu schädigen. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die funktionelle Identifizierung endogener TRPM3-Kanäle mit Hilfe von Pregnenolonsulfat deutlich leichter sein wird als mit Hilfe von D-erythro-Sphingosin.

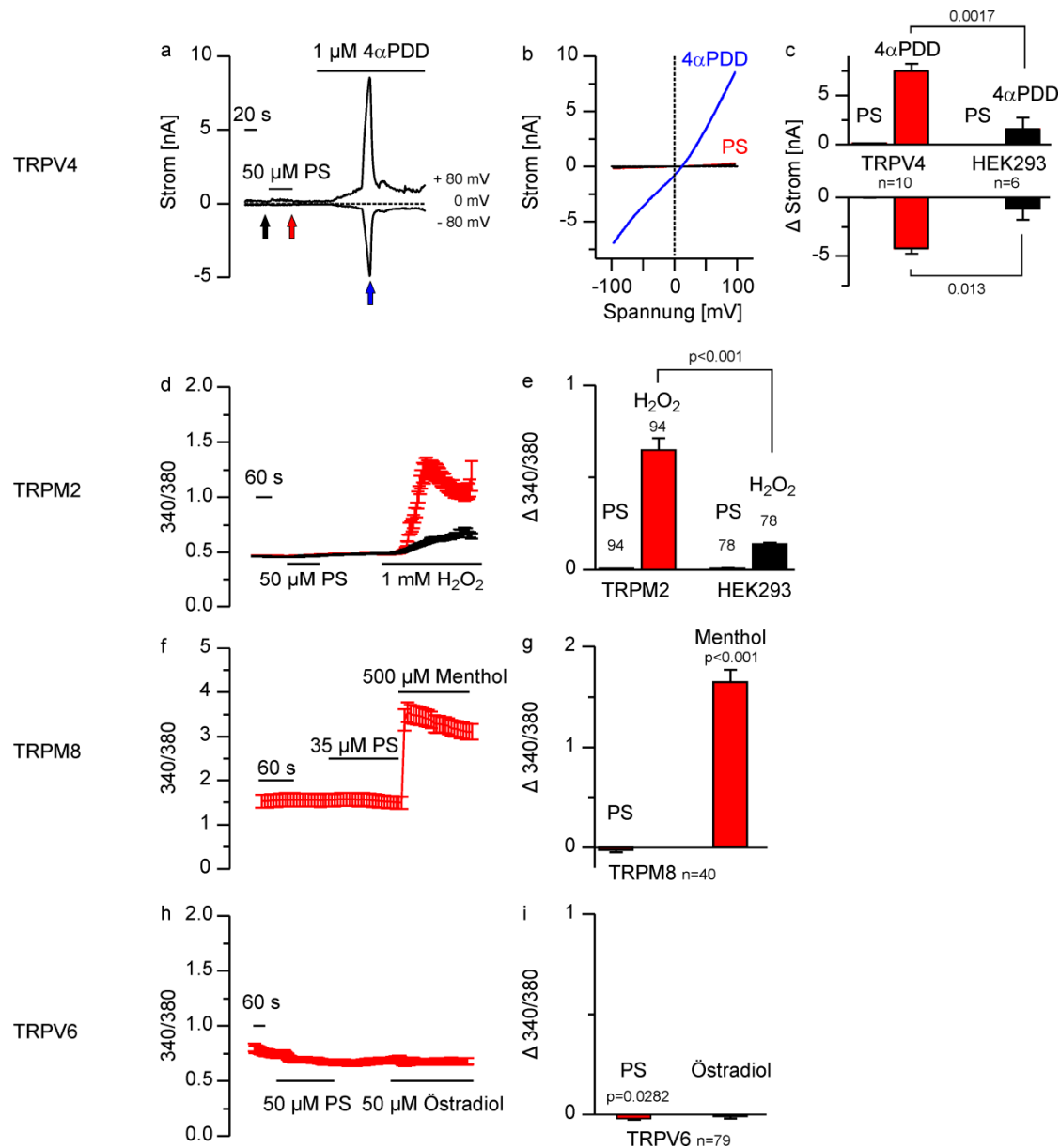
#### **2.3.4 TRP-Kanäle werden nicht generell durch Pregnenolonsulfat aktiviert.**

Viele Zellen im Körper exprimieren eine große Zahl unterschiedlicher Ionenkanäle zur gleichen Zeit. Um Pregnenolonsulfat erfolgreich als pharmakologisches Werkzeug zur funktionellen Identifizierung endogener TRPM3-Kanäle



einzusetzen, ist es nötig zu zeigen, dass andere Ionenkanäle durch diese Substanz nicht aktiviert werden. Wir untersuchten in diesem Zusammenhang die Wirkung von Pregnenolonsulfat auf andere Kanäle der TRP-Familie. Im Speziellen handelte es sich dabei um heterolog exprimierte TRPV4-, TRPM2-, TRPM8- sowie TRPV6-Kanalproteine. TRPV4-Kanäle können durch Phorbolester wie 4 $\alpha$ PDD aktiviert werden [54]. Patch-clamp Experimente in der Ganzzellkonfiguration an transient mit TRPV4 transfizierten HEK293 Zellen zeigten, dass die Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat weder zu einem Anstieg des Ein- (gemessen bei - 80 mV) noch des Auswärtsstroms (gemessen bei + 80 mV) dieser Zellen führte (Abbildung 2-11a-c). Dies war auch bei nicht transfizierten Kontrollzellen der Fall (Abbildung 2-11c). Im gleichen Experiment jedoch führte die Applikation von 1  $\mu$ M 4 $\alpha$ PDD bei TRPV4-exprimierenden Zellen zu einer starken transienten Zunahme des Ein- und des Auswärtsstroms, was auf die Aktivierung von TRPV4-Kanälen in diesen Zellen zurückzuführen war, da nicht transfizierte HEK293 Zellen diese sehr starke Zunahme nicht zeigten (Abbildung 2-11a, c). Die Strom-Spannungs-Beziehung dieses 4 $\alpha$ PDD-induzierten Stroms (Abbildung 2-11b) war dabei identisch mit der bereits beschriebenen Charakteristik von mit 4 $\alpha$ PDD aktivierten TRPV4-Kanälen [54]. Während also 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat die Ströme bei + 80 mV und - 80 mV von TRPV4-exprimierenden Zellen und auch von Kontrollzellen nicht signifikant veränderte, führte die Applikation von 1  $\mu$ M 4 $\alpha$ PDD bei TRPV4-transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu einer signifikant größeren Zunahme des Ein- und des Auswärtsstroms (Abbildung 2-11c). Diese Ergebnisse machten deutlich, dass heterolog exprimierte TRPV4-Kanäle nicht durch 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat aktiviert wurden.

Zur Untersuchung der Wirkung von Pregnenolonsulfat auf TRPM2-Kanäle wurden wieder Fura-2-basierte Kalziummessungen durchgeführt. Um die Aktivierung von TRPM2 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [41] zu verstärken, heizten wir während diesen Messungen die Perfusionsplattform und auch die Perfusionslösung auf 37 °C. Weder transient mit TRPM2 und eYFP kotransfizierte HEK293 Zellen noch nicht transfizierte Kontrollzellen reagierten auf 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einer Änderung des Fura-2-Signals. TRPM2-Kanäle wurden also nicht durch



**Abbildung 2-11 TRPV4, TRPM2, TRPM8 und TRPV6 werden nicht durch Pregnenolonsulfat aktiviert.**

(a) Ströme bei + 80 und – 80 mV einer mit TRPV4 transfizierten HEK293 Zelle. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat (PS) sowie 1  $\mu$ M 4 $\alpha$ PDD wurden wie angegeben appliziert. (b) Strom-Spannungs-Beziehungen gemessen an den in a mit Pfeilen gekennzeichneten Zeitpunkten. Die Farbe der Pfeile korrespondiert jeweils mit der Farbe der entsprechenden Strom-Spannungs-Kurve. (c) statistische Analyse der Pregnenolonsulfat- und 4 $\alpha$ PDD-induzierten Änderung der Ströme bei + 80 mV und - 80 mV von Experimenten mit 10 TRPV4-exprimierenden und 6 Kontrollzellen. (d) Zeitlicher Verlauf des Fura-2-Signals von Experimenten mit 78 nicht transfizierten HEK293 Zellen (schwarz) und 94 mit TRPM2 und eYFP kotransfizierten HEK293 Zellen (rot) gemessen bei 37 °C. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden wie einge-

zeichnet appliziert. (e) Statistische Analyse der in d gezeigten Experimente. Balken repräsentieren die durch zweiminütige Applikation der angegebenen Substanz ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals von TRPM2 transfizierten Zellen (rot) und Kontrollzellen (schwarz). (f) Zeitlicher Verlauf des Fura-2-Signals von 94 stabil TRPM8-exprimierenden HEK293 Zellen. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 500  $\mu$ M Menthol wurden wie eingezeichnet appliziert. (g) Statistische Analyse der in f dargestellten Experimente. Balken repräsentieren die durch zweiminütige Applikation der angegebenen Substanz ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals von TRPM8-exprimierenden Zellen. (h) Fura-2-Signal von 79 stabil mit TRPV6 transfizierten Zellen. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 50  $\mu$ M 17- $\beta$ -Östradiol wurden der Perfusionslösung wie angegeben zugesetzt. (i) Balken repräsentieren die durch zweiminütige Applikation der angegebenen Substanz ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals von TRPV6-exprimierenden Zellen. (c, e, g, i) p-Werte statistisch signifikanter Unterschiede wurden angegeben.

---

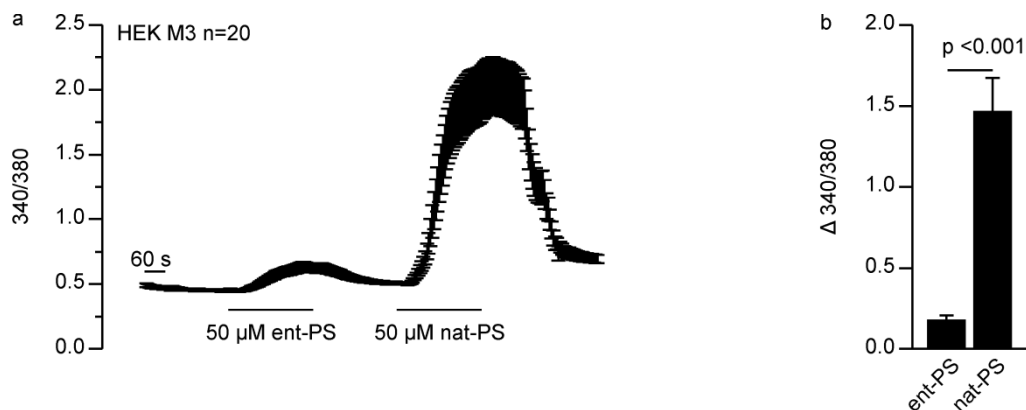
Pregnenolonsulfat aktiviert. Dass die TRPM2-Kanäle tatsächlich funktionell waren, wurde im selben Experiment durch deren Aktivierung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gezeigt.  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte bei den TRPM2-exprimierenden Zellen zu einem gegenüber Kontrollzellen signifikant höheren Anstieg des Fura-2-Signals (Abbildung 2-11b, c). Wir führten zudem fluorometrische Kalziummessungen mit stabil mit TRPM8 transfizierten HEK293 Zellen durch. Die in Abbildung 2-11f und g dargestellten Experimente zeigten, dass diese Zellen zwar auf einen Stimulus von 500  $\mu$ M Menthol wie beschrieben [14] mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antworteten und demnach auch funktionelle TRPM8-Kanäle exprimierten, jedoch nicht auf einen Stimulus von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat. Heterolog exprimierte und durch Menthol aktivierbare TRPM8-Kanäle wurden also nicht durch Pregnenolonsulfat aktiviert.

Interessant war auch die Untersuchung von TRPV6, da dieser Ionenkanal für den durch 17- $\beta$ -Östradiol induzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von T84 Zellen [55], einer Darmepithelzelllinie, verantwortlich sein soll [56]. Bisher wurde jedoch noch nicht gezeigt, dass heterolog exprimierte TRPV6-Kanäle durch 17- $\beta$ -Östradiol aktiviert werden können. Wir führten fluorometrische Kalziummessungen an stabil mit TRPV6 transfizierten HEK293 Zellen durch. TRPV6-exprimierende Zellen (Abbildung 2-11h) besaßen ein gegenüber nicht transfizierten HEK293 Zellen (z.B. Kontrollzellen in Abbildung 2-11d) erhöhtes basales Fura-2-Signal unter Ruhebedingungen. Dies war auf

das Vorhandensein konstitutiver TRPV6-Kanalaktivität und somit funktioneller TRPV6-Kanäle in diesen Zellen zurückzuführen und wurde so auch schon beschrieben [57]. Die Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat zu TRPV6-exprimierenden Zellen (Abbildung 2-11h, i) führte zu keiner Zunahme sondern eher zu einer leichten Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Demnach hatte Pregnenolonsulfat keine aktivierende Wirkung auf TRPV6-Kanäle. Da im Verlauf unserer Experimente die Applikation von 50  $\mu$ M 17- $\beta$ -Östradiol TRPV6-Kanäle nicht aktivierte, konnten wir zusätzlich zeigen, dass TRPV6 zumindest nicht direkt durch 17- $\beta$ -Östradiol aktiviert wird. Abschließend kann man sagen, dass keiner der getesteten TRP-Kanäle durch Pregnenolonsulfat aktiviert wurde. TRP-Kanäle werden folglich nicht generell durch Pregnenolonsulfat aktiviert.

### **2.3.5 Pregnenolonsulfat aktiviert TRPM3-Kanäle durch spezifische Bindung an ein Zielprotein**

Im weiteren Verlauf unserer Studie wollten wir Erkenntnisse darüber gewinnen wie Pregnenolonsulfat TRPM3-Kanäle aktiviert. Besonders interessierte uns die Frage, ob Pregnenolonsulfat TRPM3-Kanäle durch die Bindung an eine chirale Bindungsstelle aktivierte. Es wurde zuvor beschrieben und konnte auch in Experimenten unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass Pregnenolonsulfat aufgrund seiner lipophilen Struktur sehr stark in biologische Membranen integriert, was zu einer starken Zunahme der Membrankapazität führt [58]. Aufgrund dieser Effekte war es nicht auszuschließen, dass die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von TRPM3 durch einen unspezifischen Membraneffekt wie etwa eine Dehnung der Membran oder eine Änderung der Membranfluidität hervorgerufen wurde und nicht durch eine spezifische Bindung von Pregnenolonsulfat an eine chirale Bindungstasche von TRPM3 oder eines anderen Zielproteins. Vor dem Hintergrund, dass TRPM3-Kanäle als volumenregulierte Kanäle beschrieben wurden [18], war ein Membraneffekt als Aktivierungsmechanismus von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat nicht auszuschließen. Die Bindung an eine chirale Bindungsstelle ist abhängig von der dreidimensionalen Struktur eines Liganden, weshalb enantiomere Substanzen mit



**Abbildung 2-12 TRPM3 wird durch ent-Pregnenolonsulfat wesentlich schlechter aktiviert als durch nat-Pregnenolonsulfat.**

(a) zeitlicher Verlauf des Fura-2-Signals von 20 stabil mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen. 50 µM ent-Pregnenolonsulfat (ent-PS) und 50 µM nat-Pregnenolonsulfat (nat-PS) wurden wie eingezeichnet appliziert. (b) statistische Auswertung der in a dargestellten Experimente. nat-Pregnenolonsulfat induziert einen signifikant größeren Anstieg des Fura-2-Signals als ent-Pregnenolonsulfat.

---

unterschiedlichen Affinitäten an eine solche Bindungstasche binden. Wir untersuchten deshalb, ob die Aktivierung von TRPM3 durch ein nicht natürlich vorkommendes Enantiomer von Pregnenolonsulfat (ent-Pregnenolonsulfat, ent-PS) gegenüber der Aktivierung mit natürlich vorkommendem Pregnenolonsulfat (nat-Pregnenolonsulfat, nat-PS) verändert war. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass beide Enantiomere die kapazitiven Ströme in Oozyten von *Xenopus* in gleichem Maße erhöhen, also gleich stark in die biologische Membranen integrieren [58]. Wir konnten in Fura-2-basierten Kalziummessungen zeigen, dass 50 µM ent-Pregnenolonsulfat bei stabil TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen nur einen deutlich kleineren Anstieg, des Fura-2-Signals hervorrief, als 50 µM nat-Pregnenolonsulfat im gleichen Experiment (Abbildung 2-12a). Nach zweiminütiger Applikation von nat-Pregnenolonsulfat war die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration der Zellen signifikant größer als die Zunahme nach zweiminütiger Applikation von ent-Pregnenolonsulfat (Abbildung 2-12b). Unsere Ergebnisse legten nahe, dass die Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch Pregnenolonsulfat über die Bindung von Pregnenolonsulfat an eine chirale Bindungsstelle erfolgte.

## **2.4 Diskussion**

Viele Mitglieder der Familie der TRP-Kanalproteine sind ionotrope Rezeptoren. Das bedeutet, dass sie Ionenkanäle sind, die durch spezifische Agonisten direkt aktiviert werden können. Nur wenige der bisher identifizierten Agonisten von TRP-Kanälen werden vom Körper selbst gebildet [59]. Wir zeigen erstmals, dass das endogen gebildete Neurosteroid Pregnenolonsulfat TRPM3-Kanalproteine direkt aktiviert. Auch wenn in den letzten Jahren immer mehr nicht genomische Steroideffekte, die unter anderem auch an Ionenkanälen angreifen, beschrieben wurden [32, 60], so wird die Aktivität der meisten Ionenkanäle durch Steroide nur moduliert. Dass TRPM3 direkt durch Pregnenolonsulfat aktiviert wird ist daher umso erstaunlicher. Da speziell Pregnenolonsulfat auch die Eigenschaften diverser anderer Ionenkanäle beeinflusst, ist es wichtig, dass wir mit Nifedipin einen weiteren strukturell zu Pregnenolonsulfat völlig unterschiedlichen Agonisten von TRPM3 identifizieren konnten. Dadurch wird die pharmakologische Abgrenzung endogener TRPM3-Kanäle gegenüber anderen Kanälen, wie spannungsabhängigen Kalzium- und Kaliumkanälen, NMDA-, Kainate- und GABA-Rezeptoren [28, 33-37, 60] erleichtert. TRPM3 ist der erste Ionenkanal, für den gezeigt wurde, dass er durch Nifedipin aktiviert wird [46, 61]. Dieses Dihydropyridin wird nicht endogen im Körper gebildet. Nifedipin ist ein Arzneistoff, der seine blutdrucksenkende Wirkung durch die Inhibition von spannungsabhängigen Kalziumkanälen entfaltet. Es ist jedoch auszuschließen, dass unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Nifedipin auf die Aktivierung endogener TRPM3-Kanäle zurückzuführen sind, da die Dosis, die benötigt wird um heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle zu aktivieren, die therapeutische Dosis von 25-500 nM Nifedipin, die im Plasma erreicht wird [62-64], weit überschreitet. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass Nifedipin auch TRPA1, einen TRP-Kanal, der bei der Schmerz- und Temperaturwahrnehmung eine Rolle spielt, aktiviert [65-67]. Es wäre interessant zu untersuchen, inwiefern dieser Kanal auch durch Pregnenolonsulfat beeinflusst wird und inwieweit es Gemeinsamkeiten in den Sequenzen von TRPA1 und TRPM3 gibt, die Rückschlüsse auf die Nifedipinbindungsstelle geben könnten. Da TRPA1-Kanäle, im Gegen-

satz zu TRPM3, neben Nifedipin auch durch Nitrendipin, Nicardipin und Nimodipin aktiviert werden [65], sollte es möglich sein, endogen exprimierte TRPM3- und TRPA1-Kanäle pharmakologisch zu unterscheiden. Nicardipin und Nimodipin sind Inhibitoren der durch Pregnenolonsulfat und durch Nifedipin induzierten Aktivierung von TRPM3. Aufgrund ihrer Eigenschaft als Kalziumkanalblocker sind sie jedoch wenig geeignet, um endogene TRPM3-Kanäle pharmakologisch gegen Pregnenolonsulfat-sensitive, spannungsabhängige Kalziumkanäle [36, 37] abzugrenzen. Sie können aber für die weitere biophysikalische Charakterisierung heterolog exprimierter TRPM3-Kanäle von Nutzen sein. Verapamil dagegen besitzt keine Wirkung auf heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle und könnte daher die Charakterisierung endogener TRPM3-Kanäle erleichtern.

In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass das wie Pregnenolonsulfat endogen gebildete Sphingolipid D-erythro-Sphingosin humane TRPM3-Kanäle aktiviert [19]. Wir mussten feststellen, dass die von uns verwendete murine Variante von TRPM3 durch D-erythro-Sphingosin nicht in dem Maße wie die von Grimm et al. verwendete humane Variante aktiviert wird. Einen Grund hierfür könnten die Speziesunterschiede dieser Varianten darstellen. Dies erklärt jedoch nicht die von der Expression von TRPM3 unabhängigen Effekte von D-erythro-Sphingosin, die wir bei unseren Messungen stets beobachteten. Diese waren auf eine Schädigung der Plasmamembran durch D-erythro-Sphingosin zurückzuführen. Auch bei Grimm et al. [19] zeigen Kontrollzellen deutliche D-erythro-Sphingosin-induzierte Kalziumsignale, die aber stets deutlich geringer sind als die von uns beobachteten Effekte. Eine, wenn in unseren Augen auch eher unwahrscheinliche Erklärung dafür bestünde darin, dass die von uns verwendeten HEK293 Zellen deutlich schneller von D-erythro-Sphingosin zerstört werden als die bei Grimm et al. verwendeten. Ebenfalls möglich wäre, dass das von uns verwendete D-erythro-Sphingosin sich in irgendeiner Art und Weise von dem von Grimm et al. verwendeten unterschied (obwohl es von der gleichen Firma bezogen wurde). Ausgehend von unseren Ergebnissen ist jedoch eindeutig, dass Pregnenolonsulfat als pharmakologisches Werkzeug deutlich besser zur Untersuchung heterolog exprimierter, sowie zur Identifizierung und

Charakterisierung endogener TRPM3-Kanäle geeignet ist als D-erythro-Sphingosin.

Die Interaktion von Pregnenolonsulfat und TRPM3 ist sehr selektiv. TRP-Kanäle werden nicht generell durch Pregnenolonsulfat aktiviert, und bisher wurde nur für TRPV1-Kanäle gezeigt, dass sie durch Pregnenolonsulfat in ihrer Aktivität beeinflusst werden [68]. Im Gegensatz zu TRPM3 werden TRPV1-Kanäle aber durch Pregnenolonsulfat inhibiert und nicht aktiviert. Bereits kleinste Änderungen in der Steroidstruktur führen zu einer starken Verminderung oder sogar zum kompletten Verlust der Aktivierung von TRPM3. So aktivieren die strukturell dem Pregnenolonsulfat sehr ähnlichen Steroide Progesteron und DHEAS TRPM3-Kanäle überhaupt nicht mehr oder nur sehr viel schwächer. Da auch enantiomeres Pregnenolonsulfat TRPM3-Kanäle nur deutlich schwächer aktiviert als das natürlich vorkommende Pregnenolonsulfat, ist es sehr wahrscheinlich, dass Pregnenolonsulfat an eine spezifische chirale Bindungsstelle binden muss um TRPM3-Kanäle zu aktivieren.

Die meisten der bisher für Pregnenolonsulfat beschriebenen Wirkungen finden im Gehirn statt und für viele wurden bestimmte Zielproteine, darunter auch diverse Ionenkanäle, identifiziert [28]. Da TRPM3 ebenfalls stark im Gehirn exprimiert wird [17-22] könnten auch endogen exprimierte TRPM3-Kanäle für die Pregnenolonsulfatwirkungen im Gehirn verantwortlich sein. Wenn dies der Fall ist, sollte es nun mit Hilfe von Pregnenolonsulfat und Nifedipin möglich sein, endogene TRPM3-Kanäle im Gehirn funktionell zu identifizieren. Dies würde die Grundlage bilden um die physiologische Funktion von TRPM3-Kanälen in diesen Zellen aufzuklären.



### **3 Identifizierung von Pregnenolonsulfat-sensitiven TRPM3-Kanälen in Hypophysenzellen der Maus**

#### **Zusammenfassung**

Die Hypophyse spielt im Körper eine zentrale Rolle bei der Regulation des endokrinen Systems. Der Hypophysenvorderlappen bildet und sekretiert verschiedene Hormone unter Kontrolle des Hypothalamus, wobei es verschiedene Zelltypen gibt, die jeweils nur ganz bestimmte Hormone bilden [69]. Wir zeigen hier, dass der TRPM3-Agonist Pregnenolonsulfat bei der Hypophysenadenomzelllinie GH3 und auch bei einem Teil der Hypophysenzellen von Mäusen in Primärkultur einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auslöst. Dieser Effekt kann nicht wie zuvor beschrieben [70] vollkommen auf die Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zurückgeführt werden, da er weder bei GH3 Zellen durch Nifedipin noch bei Hypophysenzellen der Maus durch Verapamil unterdrückt wurde. Die Expression von TRPM3-ähnlichen Kanälen ist nicht an einen Zelltyp der Hypophyse gebunden. Vielmehr konnten wir diese Kanäle in allen hormonalen Zelltypen des Hypophysenvorderlappens funktionell nachweisen.

Erstmalig wurden endogen exprimierte TRPM3-Kanäle funktionell identifiziert. Dies ist ein wichtiger Schritt für die weitere Erforschung der physiologischen Funktion von TRPM3-Kanälen in der Hypophyse.

### **3.1 Einleitung**

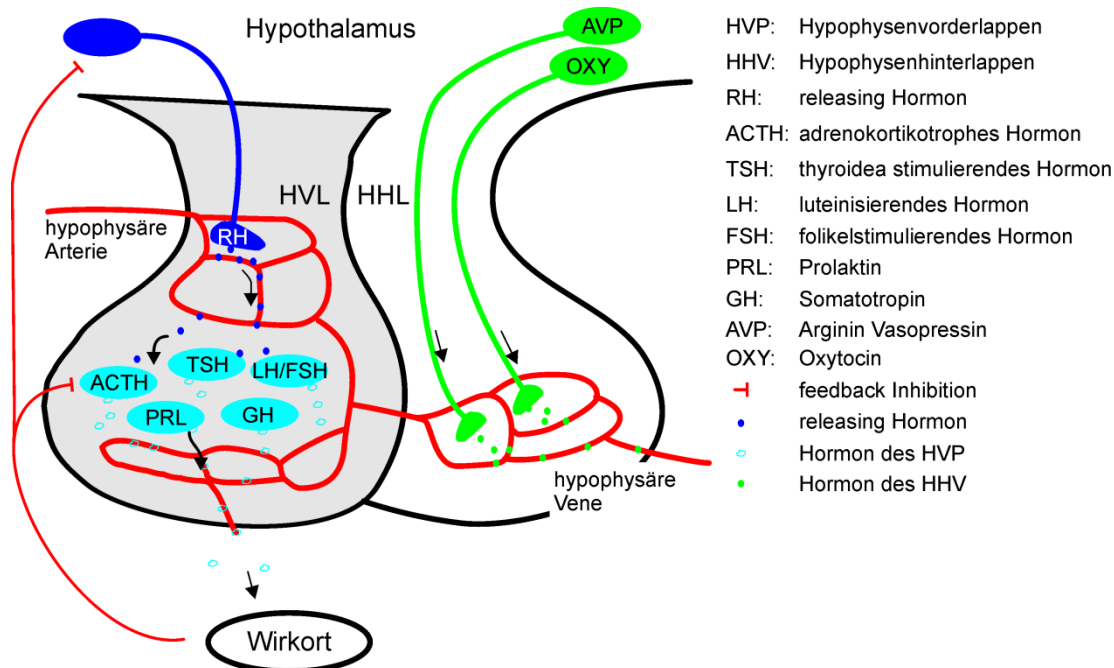
Die Hypophyse (*Glandula pituitaria*) ist eine Hormondrüse, der eine zentrale Rolle bei der Regulation des endokrinen Systems im Körper zukommt. Die Hypophyse sitzt in der *Sella turcica*, einer knöchernen Vertiefung der Schädelbasis. Die Hypophyse ist mit dem Hypothalamus über den Hypophysenstiel (*Infundibulum*) verbunden und wird in Hypophysenvorderlappen und Hypophysenhinterlappen eingeteilt. Während im Hypophysenvorderlappen verschiedene endokrine Drüsenzellen vorkommen, befinden sich im Hypophysenhinterlappen Axone, deren Zellkörper im Hypothalamus liegen (Abbildung 3-1).

Oxytocin und Adiuretin werden von Neuronen des Hypothalamus gebildet. Über axonalen Transport gelangen sie zu den Axonterminalen die den Hypophysenhinterlappen bilden und aus denen sie durch Neurosekretion als Hormone in den Körperkreislauf abgegeben werden. Adiuretin reguliert die Wasserrückresorption in der Niere, wirkt vasokonstriktorisch und setzt im Hypophysenvorderlappen das adrenokortikotrope Hormon ACTH frei. Der Hauptreiz für die Ausschüttung von Adiuretin ist die Änderung der Osmolalität im Blut [69, 71]. Adiuretinmangel führt zu einer starken Diurese. Oxytocin verstärkt die Kontraktion der Uterusmuskulatur bei der Geburt und fördert beim Stillen die Ejektion der Milch [71, 72]. Die Sekretion von Oxytocin und Adiuretin erfolgt über weitergeleitete Aktionspotenziale, die in den neuronalen Terminalen die präsynaptische Kalziumkonzentration erhöhen und so die Exozytose auslösen [71].

Der Hypothalamus produziert aber auch Faktoren, die durch Nervenendigungen in das Portalsystem des Hypophysenvorderlappens gelangen. Sie stimulieren oder hemmen die Sekretion von bestimmten Hormonen des Hypophysenvorderlappens, indem sie selektiv auf die entsprechende Zellpopulation des Hypophysenvorderlappens wirken [69, 71]. Diese Faktoren nennt man aufgrund ihrer Wirkung auch „releasing“ oder „inhibiting“ Hormone. Die vom Hypophysenvorderlappen sekretierten Hormone gelangen in die systemische Blutzirkulation und so zu ihren Wirkorten. Klassischerweise unterscheidet man fünf Zellpopulationen des Hypophysenvorderlappens, die wiederum sechs verschiedene Hormone bilden. Das Wachstumshormon Somatotropin (GH) wird von den somatotropen Zellen gebildet, welche etwa 30 - 50 % der Zellen des menschl-

chen Hypophysenvorderlappens ausmachen. Dieses anabole Hormon reguliert das Längenwachstum von Säugetieren. Die pulsatile Sekretion dieses auch Wachstumshormon genannten Stoffes wird durch Somatoliberein und Somatostatin, die beide vom Hypothalamus gebildet und ausgeschüttet werden, reguliert [69, 71]. Somatoliberein bindet an den G-Protein-gekoppelten Somatolibereinrezeptor der somatotropen Zellen, was über eine Signalkaskade die Genexpression und Sekretion von Somatotropin anregt. Somatostatin wirkt über die Bindung an den G-Protein-gekoppelten Somatostatin-2 Rezeptor der kalzium-induzierten Somatotropinsekretion entgegen. Desweiteren spielen aber auch diverse andere Faktoren bei der Sezernierung von Somatotropin eine Rolle. Hierzu gehören Ghrelin, das die Somatotropinsekretion verstärkt und auch Glukokortikoide, die die Somatotropinsekretion verstärken aber auch unterdrücken können. Physiologische Faktoren beeinflussen ebenfalls die Sekretion von Somatotropin. So erhöhen Schlaf und körperliche Anstrengung die Sezernierung von Somatotropin. Seine Wirkung entfaltet Somatotropin hauptsächlich in der Leber durch die Bindung an den Somatostatinrezeptor. Es verstärkt dort die Expression von IGF-1, welches die Wachstumseffekte von Somatotropin am Knochen und anderen Geweben auslöst [69, 71].

Die Sekretion von Prolaktin, welches von laktotropen Zellen gebildet wird, die beim Menschen etwa 15 – 20 % des Hypophysenvorderlappens bilden, bewirkt im Zusammenspiel mit Sexualhormonen und Somatotropin das Wachstum der Brustdrüse und die Differenzierung der Milchgänge, ein Effekt der besonders während der Schwangerschaft ausgeprägt ist. Es stimuliert zudem in der Laktationsphase die Synthese der Milch, indem es die Transkription der mRNA für Casein und wichtige Milchsyntheseenzyme induziert. Desweiteren ist es an der Regulation des Ovulationszyklus beteiligt. Die Expression und Sekretion wird vorwiegend durch Dopamin inhibiert. Dopamin entfaltet seine Wirkung über die Bindung an den Dopaminrezeptor D<sub>2</sub> der laktotropen Zellen und hemmt dort den cAMP-Signalweg was die intrazelluläre Kalziumkonzentration und dadurch die Prolaktinsekretion vermindert. Thyreoliberein stimuliert die Prolaktinsekretion wobei die physiologische Relevanz von Thyreoliberein für die Prolaktinsekretion unklar ist. Verstärkt wird die Prolaktinexpression durch Östrogene, Thyroid-



**Abbildung 3-1 Schematischer Aufbau der Hypophyse.**

Releasing Hormone, die von Neuronen des Hypothalamus in die hypophysäre Arterie abgegeben werden, führen zur Ausschüttung von Hormonen des Hypophysenvorderlappens. Diese gelangen über den Blutkreislauf zu ihren Wirkorten. Teilweise bewirken sie dort auch dann die Bildung und Sekretion von Faktoren, die die Hormonsekretion der Hypophyse beeinflussen. Die Hormone des Hypophysenhinterlappens werden im Hypothalamus gebildet und über axonalen Transport zu den Synapsen transportiert, aus denen sie freigesetzt werden und die zum Hypophysenhinterlappen gehören.

(Abbildung adaptiert aus [69])

hormone, Glukokortikoide, Kalzium und cAMP [69, 71]. Die gonadotropen Hormone FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) werden von gonadotropen Zellen gebildet, die etwa 10 - 15 % aller Zellen des menschlichen Hypophysenvorderlappens ausmachen. Die meisten gonadotropen Zellen bilden sowohl FSH als auch LH. Beim Mann bindet LH an G-Proteingekoppelte LH-Rezeptoren der Leydigzellen und erhöht die cAMP Produktion, was zur vermehrten Testosteronsynthese führt. Dieser Mechanismus ist essenziell wichtig für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und für die Spermatogenese. Die Rolle von FSH ist beim Mann nicht sehr gut verstanden. Es scheint bei Sertoli Zellen die Bildung von verschiedenen Proteinen zu initiieren und auch bei der Spermatogenese eine Rolle zu spielen. Bei der Frau

sind die Funktionen von LH und FSH gut untersucht. LH stimuliert die Steroidogenese der Thekazellen durch Bindung an LH-Rezeptoren. Wie sein Name bereits sagt, stimuliert FSH das Follikelwachstum. Die pulsatile Sekretion der gonadotropen Hormone, die durch Kalzium, den  $IP_3$ -DAG Signalweg und PKC reguliert wird, ist eng an die Freisetzung von Gonadoliberin gebunden. Testosteron führt zu einer verminderten Sekretion von LH und FSH und bildet daher einen negativen Rückkopplungsmechanismus [69, 71].

Das von thyrotropen Zellen gebildete, die Schilddrüse stimulierende Thyreotropin (TSH) verstärkt über einen cAMP-abhängigen Signalweg die Iodaufnahme von Thyreozyten, die Freisetzung der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ), sowie das Schilddrüsenwachstum. Weniger als 10 % der Zellen des menschlichen Hypophysenvorderlappens sind solche thyreotropen Zellen. Thyreoliberin ist der vorwiegende Stimulus für die Synthese und Sekretion von TSH. Seine Wirkung entfaltet Thyreoliberin durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor der thyotropen Zellen, was über einen Phospholipase C Signalweg zur vermehrten Bildung von  $IP_3$  und DAG führt. DAG und  $IP_3$  erhöhen über verschiedene Mechanismen die intrazelluläre Kalziumkonzentration der thyotropen Zellen, was zur vermehrten Sekretion von TSH führt. Thyreoliberin führt aber auch zur vermehrten Expression von TSH. Glukokortikoide inhibieren die TSH-Freisetzung genauso wie Dopamin und Somatostatin [69, 71].

FSH, TSH und LH sind Glykoproteinhormone und entfalten ihre Hormonwirkung erst durch die Bindung einer  $\alpha$ -Untereinheit. Dabei handelt es sich um ein kurzes Peptid, welches für alle drei der genannten Hormone gleich ist [69, 71].

Zu den nichtgonadotropen Hormonen gehören unter anderem das die Nebennierenrinde stimulierende adrenokortikotrope Hormon (ACTH), welches aufgrund seiner Wirkung auch Stresshormon genannt wird, und  $\beta$ -Endorphin, welches eine schmerzunterdrückende Wirkung besitzen soll. Beide werden von kortikotropen Zellen gebildet, die etwa 10 – 15 % der Zellen des menschlichen Hypophysenvorderlappens ausmachen. Interessanterweise entstehen ACTH und  $\beta$ -Endorphin durch Prozessierung aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem Proopiomelanokortin (POMC). Die Bildung von POMC wird durch

Kortikoliberin (CRH) und über eine cAMP-abhängige Signalkaskade induziert. Neben ACTH und  $\beta$ -Endorphin wird aus diesem Vorläufer unter anderem auch noch das Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH) gebildet, wobei dessen Funktion, ebenso wie die von  $\beta$ -Endorphin, bisher nicht vollkommen geklärt wurde. Die Sekretion von ACTH wird hauptsächlich durch CRH und Adiuretin (ADH) stimuliert und durch einen Feedbackmechanismus inhibiert. Dieser besteht darin, dass ACTH die Bildung und Sekretion von Kortisol in der Nebennierenrinde stimuliert, welches dann wiederum die Bildung von ACTH und dessen Sekretion unterdrückt [69, 73]. Seine Wirkung entfaltet ACTH durch die Bindung an den Melanokortinrezeptor der Nebenniere. Über cAMP-abhängige Prozesse wird dadurch die Steroidproduktion beeinflusst [69, 71].

Die Rattenhypophysenzelllinie GH3 [74] wird häufig als Modell für Hypophysenzellen verwendet. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie sowohl Somatotropin als auch Prolaktin bildet. Zudem exprimieren GH3 Zellen Kalziumkanäle, die mit Hilfe von Pregnenolonsulfat aktiviert werden können [70]. Da auch heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle durch Pregnenolonsulfat aktiviert werden, untersuchten wir, ob die Kalziumsignale der Hypophysenzellen durch die Aktivierung von TRPM3 zustande kamen. Um zu untersuchen, ob mit Pregnenolonsulfat aktivierbare Kalziumkanäle an der Sekretion eines bestimmten Hypophysenhormons beteiligt sein könnten, untersuchten wir, welche der beschriebenen Hypophysenzelltypen diese TRPM3-ähnlichen Kanäle exprimieren.

## **3.2 Material und Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

GH3 Zellen [74] wurden in Ham's F10 Medium (Invitrogen), welches 15 % Pferdeserum (Invitrogen) und 2.5 % FKS sowie 2 mM Glutamax (Invitrogen) enthielt, im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.2.1) zweimal bis dreimal pro Woche passagiert.

### **3.2.2 Fluorometrische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration**

Es wurden fluorometrische Kalziummessungen mit Fura-2 mit dem zuvor beschriebenen Messplatz (Kapitel 2.2.2) durchgeführt. Alle Zellen wurden wie zuvor beschrieben für 30 Minuten im jeweiligen Kulturmedium bei Raumtemperatur mit 2,5 µM Fura-2 AM inkubiert. Vor Beginn der Messungen wurden die Zellen dreimal mit dem auch während der Messung verwendeten Puffer gewaschen. Diese Badlösung enthielt (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Der pH-Wert der Lösung wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt. 50 µM Pregnenolonsulfat-haltige Badlösung wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge einer 50 mM Pregnenolonsulfatstocklösung hergestellt, die in DMSO bereitet wurde. 100 µM Nifedipin-haltige Lösung wurde auf die gleiche Weise durch Zugabe der entsprechenden Menge von DMSO hergestellt, das 100 mM Nifedipin enthielt. In allen Experimenten mit Hypophysenzellen in Primärkultur enthielt diese Lösung zusätzlich 5 µM Verapamil, was durch die Zugabe der entsprechenden Menge einer 10 mM Verapamil DMSO Stocklösung erreicht wurde. Für alle Experimente, bis auf die mit anschließender Antikörperfärbung, wurde eine geschlossenen Perfusionskammer (Warner Instruments) verwendet. Die Experimente mit anschließender Antikörperfärbung wurden in einem Deckgläschenhalter (Molecular Probes) durchgeführt. Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt.

### **3.2.3 Präparation von Hypophysenzellen der Maus**

Zur Präparation von Hypophysenzellen wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und direkt im Anschluß dekapitiert. Die Schädeldecke wurde mit Hilfe einer kleinen Knochenschere entfernt und das Gehirn mit Hilfe eines Spatels

entnommen. Die Hypophyse bleibt dabei an der Schädelbasis zurück. Die Hypophyse wurde entnommen und in einer 35 mm Schale mit gekühlten Dispersionsmedium I aufgenommen. 50 ml Dispersionsmedium I enthielten: 50 ml HBSS (Invitrogen), 50 mg BSA (Sigma), 10 mM HEPES (Sigma), 10 mM Glukose. Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH auf 7,3 - 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde zusätzlich 3 mg / ml Collagenase II (CLSII, Biochrom) zugegeben und danach sterilfiltriert. Die Hypophyse wurde dann in 8-12 Stücke geschnitten und in einem Reagiergefäß mit 1 ml kaltem Dispersionsmedium I überführt. Daraufhin wurden die Hypophysenstücke zuerst zehnmal mit einer 1000 µl Pipettenspitze und danach zehnmal mit einer 200 µl Pipettenspitze titriert. Anschließend wurden die Hypophysenteile für 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und währenddessen wiederum dreimal wie beschrieben titriert. Danach wurden die Hypophysenstücke fünf Minuten bei 1300 U / min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Dispersionsmedium II aufgenommen und wiederum wie beschrieben titriert. 50 ml Dispersionsmedium II enthielt: 50 ml D-MEM und 50 mg BSA. Vor Gebrauch wurde die benötigte Menge sterilfiltriert. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurden auf mit 0.1 % Poly-L-Lysin beschichteten, runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 25 mm für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und dann mit 2 ml Kulturmedium überschichtet. 100 ml Kulturmedium enthielten: 89,8 ml D-MEM, 200 µl Penicilin / Streptomycin (10.000 U / ml Penicilin und 10 mg / ml Streptomycin) sowie 10 ml FKS. Die Zellen wurden stets am Tag der Präparation für Experimente verwendet.

### **3.2.4 Immunohistochemische Experimente**

Für alle fluorometrischen Kalziummessungen von Hypophysenzellen, denen sich eine immunohistochemische Färbung anschloß, wurden die Zellen auf „etched Grid“ Deckgläschen (Belco) kultiviert. Diese speziellen Deckgläschen besitzen ein auf ihrer Oberfläche eingätztes Gitter, dessen Felder nummeriert sind. Anhand dieses Gitters kann die Position des Deckgläschens auf dem Mikroskop wiedergefunden werden, auch wenn es zwischendurch verschoben oder ganz entfernt wurde. Hierzu wurde der für die Messung gewählte



Bildausschnitt zuerst im Durchlicht mit dem gleichen Mikroskop, mit dem anschließend auch die fluorometrischen Kalziummessungen durchgeführt wurden, fotografiert und somit die genaue Position und Ausrichtung des „etched Grid“ Deckglases auf dem Mikroskop festgehalten. Anhand dieses Fotos konnten nach Abschluss der immunohistochemischen Färbung die Zellen, von denen zuvor die Kalziumsignale mit Fura-2 gemessen wurden, wiedergefunden und ungefähr gleich auf dem Mikroskop ausgerichtet werden. Zuvor wurden jedoch die Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen mit Hilfe der Kalziummessungen identifiziert. Hierzu wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit der Badlösung in einen Deckgläschenhalter eingespannt und mit 500 µl Badlösung, die 5 µM Verapamil enthielt, überschichtet. Die Applikation des Pregnenolonsulfats erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 500 µl der beschriebenen Badlösung die 100 µM Pregnenolonsulfat enthielt. Dadurch wurden die Zellen Pregnenolonsulfat in einer Konzentration von 50 µM ausgesetzt. Um die Applikation von Pregnenolonsulfat zu beenden, wurde mit Badlösung so lange verdünnt, bis die Pregnenolonsulfatkonzentration in der Lösung unter 5 µM lag.

Um wirklich die Daten aller Zellen in die Auswertung einfließen zu lassen, beschlossen wir, die Analyse mit Hilfe des bereits zuvor verwendeten Programmes ImageJ zu automatisieren. Um alle einzeln liegenden und Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen im untersuchten Bildausschnitt zu detektieren, wurden zwei Kriterien festgelegt. Über die Fläche des Fura-2-Signals der Zellen des ersten 340 / 380 Bildes einer Messung wurden die einzeln liegenden Zellen bestimmt. Alle zusammenhängenden Bereiche mit einem Fura-2-Signal zwischen 0 und 1 auf dem ersten Bild der Zellen, die zwischen 50 und 350 Pixel groß waren, wurden als einzelne Zellen angesehen und automatisch als ROI markiert. Dies entsprach bei einer Pixelgröße der Kamera von 6.45 µm x 6.45 µm und einer zehnfachen Vergrößerung einer Fläche von ungefähr 21-146 µm<sup>2</sup>, was bei Annahme einer runden Zelle einem Durchmesser zwischen 5 µm und 14 µm entsprechen würde. Diese Parameter wurden gewählt, da sie kleine unspezifische Zelltrümmer und große Zellklumpen ausschlossen und der Größe einer durchschnittlichen Hypophysenzelle (Durchmesser 12-13 µm bei adulten Ratten) entsprachen [75]. Von den so erhaltenen ROIs

wurde der Verlauf des Fura-2-Signals über die Zeit ermittelt. Von diesen Zellen wurden alle als Pregnenolonsulfat sensitiv eingestuft, deren Fura-2-Signal nach zweiminütiger Applikation von Pregnenolonsulfat um mehr als 0,2 arbiträre Einheiten angestiegen war.

Nach Beendigung der Messung der Kalziumsignale wurde das „etched grid“ Deckglässchen in eine Zellkulturschale überführt und die Zellen für fünf Minuten mit 10 % Formaldehyd in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal für je eine Minute mit TBS gewaschen und anschließend für fünf Minuten mit 0.1 % Triton X100 (Sigma Aldrich) / TBS permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden wiederum dreimal für je eine Minute mit TBS gewaschen und unspezifische Bindungstellen anschließend durch eine einstündige Inkubation mit 5 % BSA / TBS blockiert. Die vereinzelt Hypophysenzellen wurden über Nacht bei 4 °C mit einem der folgenden primären Antikörper in 1 % BSA / TBS in der angegebenen Verdünnung auf einem Schüttler inkubiert: Somatotropin 1:50000 (GH), Prolaktin 1:50000 (PRL), adrenokortikotropes Hormon 1:50000 (ACTH),  $\beta$ -Endorphin 1:10000,  $\beta$ -Untereinheit des follikelstimulierenden Hormons 1:50000 (FSH),  $\beta$ -Untereinheit des thyrostimulierenden Hormons (TSH),  $\beta$ -Untereinheit des luteinisierenden Hormons 1:10000 (LH),  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoproteinhormone 1:50000 ( $\alpha$ UE) (Alle Antikörper von Dr. A. F. Parlow, Scientific Director, National Hormone & Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Center, 1000 W. Carson St., Torrance, California 90509, U.S.A.). Nicht gebundener Erstantikörper wurde durch fünfmaliges waschen mit TBS entfernt.

Die Zellen wurden anschließend mit dem Zweitantikörper (Anti rabbit Alexa Fluor 488 1:1000, Invitrogen) in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellen wiederum fünfmalig mit TBS gewaschen.

Die Zellen, von denen wir zuvor die Kalziumsignale gemessen hatten, wurden anhand des auf dem Deckglass eingezähten Gitters wiedergefunden und ausgerichtet und mit den passenden Filtern für die Alexa Fluor 488 Fluoreszenz fotografiert (Anregungsfilter D480/30, Emissionsfilter D535/40, dichroischer Spiegel Q505 LP; alle AHF Analysentechnik). Die Belichtungszeit der Kamera wurde

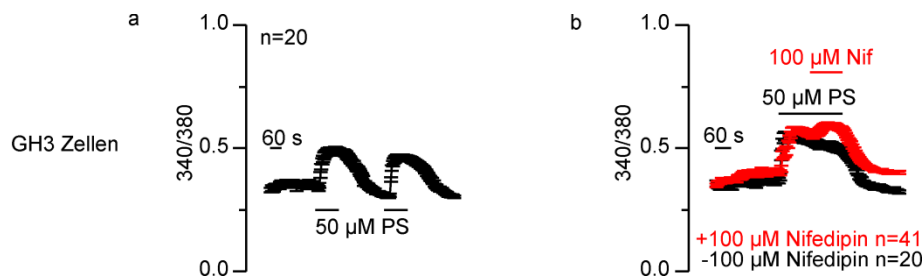
dabei für Färbungen auf ein bestimmtes Hormon stets beibehalten. Die Fotos wurden danach mit Hilfe von ImageJ gedreht, verschoben und zugeschnitten um eine perfekte Überlagerung zwischen den Kalziumexperimenten und den immunhistochemischen Färbungen zu erlangen. Die hierfür benötigten Parameter wurden ebenfalls mit ImageJ ermittelt, indem der Unterschied der Koordinaten von bestimmten Zellen und der Winkel zwischen der Verbindungslinie zweier Zellen im Bild vor und nach der Färbung bestimmt wurde. Die Differenz dieser Parameter zwischen den Durchlichtbildern vor und nach der Färbung ergab dann einen Wert für die Verschiebung in x und y Richtung sowie einen Winkel um den das Bild gedreht wurde. Für jede Hormonfärbung wurde dann ein individueller Grenzwert festgelegt. Alle Pixel, die diesen Grenzwert überschritten, wurden als für das jeweilige Hormon gefärbt angesehen. Eine Zelle wurde als positiv gefärbt angesehen, wenn ihre ROI solche Pixel enthielt.

Für jedes Experiment wurde der Anteil der Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen und der immunhistochemisch gefärbten Zellen von der Gesamtheit der Einzelzellen ermittelt. Darüber hinaus wurde auch der Anteil der immunhistochemisch gefärbten Zellen der Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen ermittelt.

### **3.3 Ergebnisse**

#### **3.3.1 Hypophysenzellen besitzen TRPM3-ähnliche Kanäle.**

Büküşoğlu et al. zeigten mit Hilfe von fluorometrischen Kalziummessungen, dass GH3 Zellen auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antworten [70]. Wird Pregnenolonsulfat aus der Perfusionslösung wieder entfernt, so sinkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder auf das Ausgangsniveau. Büküşoğlu et al. diskutieren, dass der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle ausgelöst wird. Diese These stützt sich darauf, dass Nifedipin das durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Kalziumsignal der GH3 Zellen unterdrückt [70]. Wir konnten jedoch bereits zeigen, dass Nifedipin auch die Aktivierung von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat in der gleichen Weise beeinflusst (Kapitel 2.3.2). Wir untersuchten deshalb mit Hilfe von fluorometrischen Kalziummessungen, ob die bei Büküşoğlu et al. beschriebenen Pregnenolonsulfateffekte in GH3 Zellen eventuell auf die Aktivierung von endogen exprimierten TRPM3-Kanälen zurückzuführen sind. Fura-2-geladene GH3 Zellen antworteten auch in unseren Experimenten auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abbildung 3-2a). Wurde Pregnenolonsulfat wieder aus der Perfusionslösung entfernt, so sank daraufhin die Kalziumkonzentration der GH3 Zellen wieder auf die Ruhekonzentration. Interessanterweise antworteten GH3 Zellen, die mit 50  $\mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat stimuliert wurden, auf die zusätzliche Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Nifedipin (Abbildung 3-2b, rote Spur) mit einer weiteren Zunahme des Fura-2-Signals, die ausblieb, wenn die Zellen über den gleichen Zeitraum nur mit Pregnenolonsulfat stimuliert wurden (Abbildung 3-2b, schwarze Spur). Dies zeigte, dass die Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignale von GH3 Zellen, zumindest zu einem Großteil, nicht auf die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, die durch Nifedipin inhibiert werden, erklärt werden können. Dass Nifedipin, welches ebenfalls rekombinante TRPM3-Kanäle aktiviert (Kapitel 2.3.1), zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration von mit Pregnenolonsulfat stimulierten GH3 Zellen führte, legte die Vermutung nahe, dass diese Kalziumsignale auf



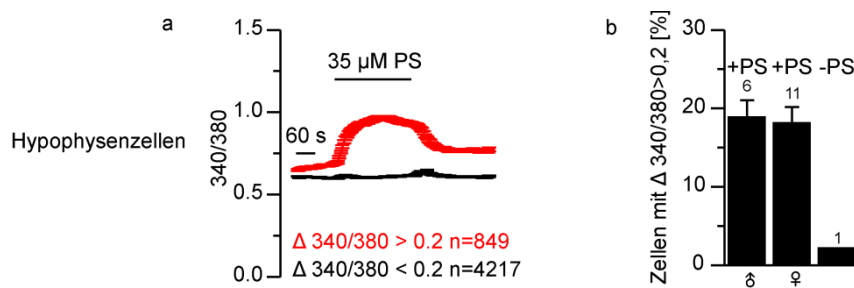
**Abbildung 3-2 Pregnenolonsulfat erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration von GH3 Zellen.**

(a, b) Mittlerer zeitlicher Verlauf des Fura-2-Signals von GH3 Zellen. (a) Mittelwert von 20 GH3 Zellen. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat wurden zu den angegebenen Zeitpunkten appliziert. (b) Die rote Spur zeigt den Mittelwert von 41 GH3 Zellen, die zu den angegebenen Zeiten mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 100  $\mu$ M Nifedipin (Nif) stimuliert wurden. Die schwarze Spur zeigt vergleichbare Experimente mit 20 Zellen jedoch ohne die Zugabe von Nifedipin.

---

die Aktivierung von endogenen TRPM3-Kanälen zurückzuführen waren. Wir untersuchten im weiteren Verlauf, ob auch Hypophysenzellen in Primärzellkultur endogene TRPM3-artige Kanäle exprimierten. Hierfür wurde die Hypophyse der Maus präpariert und durch einen Collagenaseverdau zu Einzelzellen dissoziiert. Die Einzelzellen wurden auf Deckgläsern zwei Stunden kultiviert. Die so vereinzelt Hypophysenzellen wurden mit Fura-2 geladen und der Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration anhand der Fura-2-Fluoreszenz der einzelnen Zellen verfolgt. Bei allen Experimenten mit primären Hypophysenzellen wurde der Badlösung zusätzlich 5  $\mu$ M Verapamil zugegeben, um die spontane Aktivität der spannungsabhängigen Kalziumkanäle zu minimieren und somit Pregnenolonsulfat-spezifische Signale besser zu detektieren. Zuvor konnten wir zeigen, dass Verapamil die Aktivierung heterolog exprimierter TRPM3-Kanäle durch Pregnenolonsulfat nicht beeinflusst (Kapitel 2). Auch ein Teil der Hypophysenzellen in Primärkultur reagierten auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, was auf die Expression von TRPM3-Kanälen in diesen Zellen schließen ließ.

Abbildung 3-3a zeigt den zeitlichen Verlauf des Fura-2-Signals von Hypophysenzellen, deren Fura-2-Signal während der Applikation von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat um mehr als 0,2 arbiträre Einheiten anstieg (rote Spur), und den



**Abbildung 3-3 Ein Teil der Hypophysenzellen in Primärkultur besitze funktionelle TRPM3-ähnliche Kanäle**

(a) Fluorometrische Kalziummessungen von mit Fura-2 geladenen, vereinzelt Hypophysenzellen deren Fura-2-Signal zu Beginn des Experimentes kleiner als 1 und größer als 0 war. In der roten Spur ist der mittlere Verlauf des Fura-2-Signals aller 849 Zellen zusammengefasst, die auf die Applikation von Pregnenolonsulfat mit einer Erhöhung des Fura-2-Signals von mehr als 0,2 antworteten. Der mittlere Verlauf des Fura-2-Signals aller anderen 4217 Zellen ist in der schwarzen Spur zusammengefasst. Während des gesamten Experiments enthielt die Badlösung zusätzlich 5  $\mu$ M Verapamil. (b) Prozentualer Anteil der Hypophysenzellen, die auf die Zugabe von Pregnenolonsulfat (+PS) oder 1 % DMSO (-PS), mit einer Zunahme des Fura-2-Signals von mehr als 0,2 antworteten, an der Gesamtheit aller einzeln liegenden Zellen. Bei den Experimenten mit Pregnenolonsulfat wurde zusätzlich zwischen Versuchen mit männlichen und weiblichen Tieren unterschieden. Die Zahlen über den Balken zeigen stets die Anzahl der für die Versuche präparierten Mäuse.

Verlauf aller anderen Zellen (schwarze Spur). In diesen Experimenten wurden nur solche Zellen ausgewertet, die als einzeln liegende Zellen deklariert wurden (siehe Abschnitt 3.2). In den Experimenten lag der Anteil der Zellen, die auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg des Fura-2-Signals  $> 0,2$  antworteten, stets bei etwa  $18,4 \pm 1,5$  %. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Zellen von der Präparation einer weiblichen oder männlichen Maus stammten (Abbildung 3-2b). Wurden die Zellen dagegen nicht mit Pregnenolonsulfat stimuliert, so lag der Anteil der Zellen die als sensitiv eingestuft wurden nur bei 2,2 % (Abbildung 3-2b). Dadurch konnten wir zeigen, dass die durch unsere Kriterien als Pregnenolonsulfat-sensitiv eingestuften Zellen, nur zu einem geringen Anteil fälschlicherweise als Pregnenolonsulfat-sensitiv identifiziert wurden.

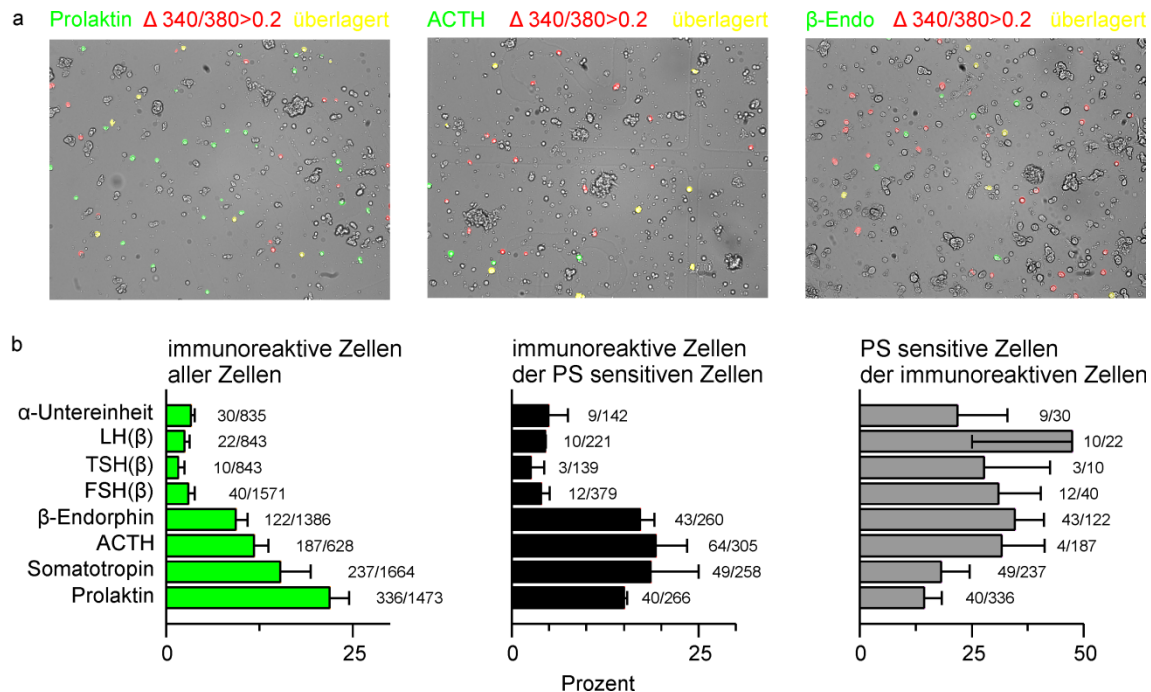
### **3.3.2 TRPM3-ähnliche Kanäle werden von allen Zelltypen des Hypophysenvorderlappens gebildet.**

Um zu untersuchen, ob nur ein bestimmter Hypophysenzelltyp Pregnenolonsulfat-sensitive Kanäle exprimiert, wurden in fluorometrischen Messungen die Pregnenolonsulfat-sensitiven, einzeln liegenden Hypophysenzellen identifiziert (Kapitel 3.2) und anschließend auf eines der in der Hypophyse gebildeten Hormone (Kapitel 3.1, [69, 71]) gefärbt. Für jedes Hormon wurden so Experimente mit Zellen aus 2 - 4 unabhängigen Präparationen durchgeführt. Ausgewertet wurde für jedes Experiment der Anteil der immunoreaktiven Zellen an der Anzahl der Gesamtzellen, der Anteil der Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen an den immunoreaktiven Zellen sowie der Anteil der immunoreaktiven Zellen an den Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen. Abbildung 3-4a zeigt Beispiele solcher Experimente anhand von Prolaktin, ACTH und  $\beta$ -Endorphin. Bei Experimenten, in denen auf Prolaktin gefärbt wurde, waren etwa 21 % der Zellen positiv auf Prolaktin gefärbt. Von den Prolaktin-positiven Zellen hatten nur etwa 14 % zuvor auf Pregnenolonsulfat mit einem deutlichen Anstieg des Fura-2-Signals geantwortet. Von den Zellen, die in diesen Experimenten auf Pregnenolonsulfat geantwortet hatten, waren wiederum nur etwa 14 % auf Prolaktin gefärbt.

Wurde nach der Messung der Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumantwort der Zellen auf Somatotropin gefärbt, so waren etwa 15 % aller analysierten Zellen positiv für Somatotropin. Von diesen hatten wiederum nur etwa 18 % zuvor auf Pregnenolonsulfat mit einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration geantwortet. Von allen Zellen, die in diesen Experimenten auf Pregnenolonsulfat mit einer deutlichen Zunahme des Fura-2-Signals reagierten, waren wiederum nur etwa 16 % positiv für Somatotropin.

Bei Experimenten, in denen sich der Messung der Kalziumsignale eine Färbung auf ACTH anschloss, waren ~ 12 % aller Zellen ACTH-positiv. Von diesen hatten wiederum etwa 31 % zuvor auf Pregnenolonsulfat geantwortet. Von allen Zellen, die zuvor auf Pregnenolonsulfat antworteten, waren etwa 18 % positiv für ACTH. Eine ähnliche Verteilung wie für ACTH wurde auch für  $\beta$ -Endorphin festgestellt. Hier waren etwa 9 % der Zellen immunohistochemisch gefärbt. Von diesen hatten etwa 32 % auf Pregnenolonsulfat reagiert. Von allen

## Identifizierung endogener TRPM3-Kanäle in Hypophysenzellen



**Abbildung 3-4 Immunohistochemische Charakterisierung der Pregnenolonsulfat-sensitiven Hypophysenzellen.**

(a) Beispiele für vereinzelte Hypophysenzellen die auf Prolaktin, ACTH oder  $\beta$ -Endorphin gefärbt wurden. Einzeln liegende Zellen, die auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg des Fura-2-Signals um mehr als 0,2 antworteten, sind rot gekennzeichnet. Die für das jeweils angegebene Hormon immunoreaktiven Zellen wurden grün gekennzeichnet. Zellen, die für das jeweilige Hormon gefärbt wurden und zuvor auf Pregnenolonsulfat antworteten, sind gelb dargestellt. (b) Statistische Auswertung der fluorometrischen Kalziummessungen mit anschließender immunhistochemischer Färbung. Die grünen Balken repräsentieren die mittlere Anzahl der für das jeweils angegebene Hormon immunoreaktiven Zellen aller ausgewerteten Zellen pro Präparation. Die schwarzen Balken zeigen den Anteil der für das jeweils angegebene Hormon immunoreaktiven Zellen an den Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen. Die grauen Balken zeigen den Anteil der Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen an den für das jeweils angegebene Hormon immunoreaktiven Zellen.

Pregnenolonsulfat-sensitiven Zellen, zeigten wiederum nur etwa 16 % eine deutliche Färbung für  $\beta$ -Endorphin. Die vergleichbaren Werte für ACTH und  $\beta$ -Endorphin waren nicht verwunderlich, da beide Hormone vom gleichen Hypophysenzelltyp exprimiert werden.

Nur sehr wenige Zellen wurden positiv auf die  $\beta$ -Untereinheiten von TSH, FSH und LH gefärbt. Für alle drei Hypophysenhormone waren stets weniger als 3 %



der Gesamtzellen positiv. Für die gemeinsame  $\alpha$ -Untereinheit dieser Hormone waren nur etwas mehr als 3 % der Zellen gefärbt. Von den immunoreaktiven Zellen hatten wiederum jeweils nur weniger als 50 % zuvor auf Pregnenolonsulfat reagiert. Von den Zellen, die zuvor auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg des Fura-2-Signals um mehr als 0,2 geantwortet hatten, waren stets weniger als 5 % positiv für die  $\beta$ -Untereinheiten von TSH, LH oder FSH sowie für die gemeinsame  $\alpha$ -Untereinheit der drei Hormone.

Die von uns ermittelte prozentuale Verteilung der Hypophysenzelltypen wich von der in der Literatur für Menschen beschriebenen ab [69] und lag für alle Zelltypen unter den beschriebenen Werten. Ein Grund hierfür könnte in der Präparation der Zellen liegen. Es ist nicht auszuschließen, dass in unserer Präparation jeweils auch Zellen, die nicht aus dem Hypophysenvorderlappen stammten, enthalten waren. Ebenfalls könnten bestimmte Zelltypen im Verlauf der Präparation leichter Schaden nehmen als andere. Eindeutig war aber, dass Pregnenolonsulfat-aktivierbare, TRPM3-ähnliche Kalziumkanäle nicht exklusiv von einem bestimmten Zelltyp des Hypophysenvorderlappens exprimiert wurden.

### **3.4 Diskussion**

Wir konnten in dieser Arbeit widerlegen, dass die von Büküşoğlu et al. identifizierten Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignale von GH3 Zellen ausschließlich auf die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zurückzuführen sind. Gleichzeitig wäre es aber auch vorschnell aus den hier vorgestellten Daten zu schließen, dass die Pregnenolonsulfat und Nifedipin induzierten Kalziumsignale von GH3 Zellen und Hypophysenzellen durch die Aktivierung von TRPM3 zustande kamen. Wir benötigten zur Aktivierung von TRPM3-ähnlichen Kanälen der Hypophyse Pregnenolonsulfatkonzentrationen, die auch zur Aktivierung von heterolog exprimierten TRPM3-Kanälen benötigt werden (siehe Kapitel 2.3.1, [26]), was ein Hinweis darauf ist, dass die Pregnenolonsulfat-aktivierten Kalziumkanäle von GH3 und Hypophysenzellen TRPM3-Kanäle sind. Pregnenolonsulfat und Nifedipin beeinflussen aber auch die Aktivität anderer Ionenkanäle [33, 35, 36, 60, 65, 68], die für die hier beschriebenen Kalziumsignale verantwortlich sein könnten. Aus diesem Grunde wurden weitergehende elektrophysiologische Untersuchungen mit GH3 Zellen und Hypophysenzellen in Primärkultur durchgeführt. Die Pregnenolonsulfat- und Nifedipin-induzierten Ströme dieser Zellen zeigen die Strom-Spannungs-Charakteristik heterolog exprimierter TRPM3-Kanäle (Oberwinkler, nicht veröffentlichte Daten). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Nifedipin und Pregnenolonsulfat in diesen Zellen tatsächlich TRPM3-Kanäle aktivieren. Dazu kommt, dass neben den funktionellen Nachweisen Pregnenolonsulfat-aktivierbarer TRPM3-ähnlicher Kanäle auch bereits die Expression von TRPM3-Kanälen in der Hypophyse gezeigt wurde [22, 76].

Kalziumsignale sind verantwortlich für die regulierte Sekretion von Hormonen, die in der Hypophyse gebildet werden [69, 71]. Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignale von Hypophysenzellen könnten daher prinzipiell an der Regulation dieser physiologischen Funktion der Hypophyse beteiligt sein, was auch an anderer Stelle bereits diskutiert wurde [70]. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass unter den Hypophysenzellen, die TRPM3-ähnliche Kanäle exprimieren, alle hormonbildenden Zelltypen des Hypophysenvorderlappens vertreten sind. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass TRPM3-Kanäle physiologisch für die

Sekretion eines spezifischen Hormons der Hypophyse von Bedeutung sind. Kalzium spielt jedoch nicht nur eine Rolle bei der Sekretion, sondern kann auch über zahlreiche weitere kalziumabhängige Prozesse eine Zelle beeinflussen [2]. So könnten TRPM3-Kanäle über die Aktivierung kalziumabhängiger Signalwege die Hypophyse in ihrer Funktion beeinflussen. Interessanterweise wird ACTH ab der zwölften Woche, also zu einem relativ frühen Stadium der Embryogenese, von der fötalen Hypophyse gebildet. Das für die ACTH-Ausschüttung benötigte Kortikoliberin ist dabei zum Großteil plazentalen Ursprungs [77]. Das so ausgeschüttete ACTH stimuliert die fötale Steroidbildung der sich noch in der Entwicklung befindenden Nebenniere. Dabei wird primär DHEAS gebildet [78, 79], ein Steroid, welches ebenfalls TRPM3-Kanäle aktiviert (Kapitel 2). DHEAS wird aus Pregnenolon und Pregnenolonsulfat gebildet. Es ist daher davon auszugehen, dass auch diese Substanzen im Plasma des Fötus vorliegen. Die Bildung von Steroiden während der Embryogenese könnte über die Aktivierung von TRPM3-Kanälen die fötale Hypophyse beeinflussen.

Während beim Menschen signifikante Konzentrationen von Pregnenolonsulfat nachgewiesen werden konnten, war dies bei Ratten bisher nicht der Fall [28]. Die von uns verwendeten Konzentrationen von 35  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 50  $\mu\text{M}$  übersteigen jedoch auch alle bisher beim Menschen gemessenen Konzentrationen von Pregnenolonsulfat bei weitem. Diese liegen mit 0.09  $\mu\text{M}$  in der Hypophyse und 0.2 – 0.4  $\mu\text{M}$  im Plasma [80-82] auch um etwa das 200-fache niedriger als der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 23  $\mu\text{M}$  für die Aktivierung von rekombinanten TRPM3-Kanälen durch Pregnenolonsulfat [61]. Auf der anderen Seite ist völlig unklar, ob unter bestimmten Bedingungen auch höhere Konzentrationen von Pregnenolonsulfat im Körper erreicht werden. Im Nabelschnurblut von Neugeborenen und im maternalen Plasma bei der Geburt wurde Pregnenolonsulfat in einer Konzentration von bis zu 5  $\mu\text{M}$  gefunden [80, 83-86]. Diese Konzentration ist ausreichend um rekombinante TRPM3-Kanäle in ihrer Aktivität zu beeinflussen (Kapitel 2.3.1). Dass gerade bei Neugeborenen die höchsten Pregnenolonsulfatkonzentrationen nachgewiesen wurden, macht die Hypothese, dass TRPM3-Kanäle für die Regulation oder Entwicklung der fötalen Hypophyse wichtig sein könnten, nochmals interessanter.

Auch unter pathophysiologischen Bedingungen wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von Pregnenolonsulfat gemessen. Bei Patienten mit einem adrenokortikalen Karzinom und auch bei Patienten mit plazentaler Sulfatase-defizienz, wurden Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 6  $\mu$ M Pregnenolonsulfat nachgewiesen [87, 88]. Diese Konzentrationen reichen aus um heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle zu aktivieren. Es ist daher vorstellbar, dass die Aktivierung von TRPM3-Kanälen unter diesen Umständen von klinischer Relevanz ist. Keine Daten gibt es bisher darüber, ob die Konzentration von Pregnenolonsulfat lokal und zeitlich begrenzt, vergleichbar mit der Ausschüttung eines Neurotransmitters, stark ansteigen kann und somit lokal TRPM3-Kanäle aktiviert [28].

Ebenso ist es denkbar, dass TRPM3-Kanäle unter physiologischen Bedingungen auch unabhängig von Pregnenolonsulfat aktiviert werden können. So besteht die Möglichkeit, dass eine bisher nicht identifizierte endogene Substanz TRPM3-Kanäle auch bei physiologischen Konzentrationen aktiviert und somit die Aktivität endogener TRPM3-Kanäle in der Hypophyse reguliert.

Die funktionelle Identifizierung von TRPM3-Kanälen der Hypophyse bildet den Ankerpunkt zur zukünftigen Aufklärung der physiologischen Funktion von TRPM3-Kanälen.

## 4 TRPM3-Kanäle verstärken die Insulinsekretion von pankreatischen $\beta$ -Zellen<sup>2</sup>

### Zusammenfassung

Langerhans-Inseln bilden den endokrinen Teil des Pankreas. Diese Zellkluster bestehen aus verschiedenen Zelltypen wobei die meisten der Inselzellen  $\beta$ -Zellen sind. Pankreatische  $\beta$ -Zellen sind im Körper verantwortlich für die Produktion und die regulierte Freisetzung von Insulin und damit von essentieller Bedeutung für den Energiestoffwechsel von Säugetieren. Der zweithäufigste Zelltyp der Langerhans-Inseln sind  $\alpha$ -Zellen. Diese bilden und sekretieren Glukagon, welches ebenfalls an der Regulation des Energiestoffwechsels beteiligt ist. Wir konnten TRPM3-Kanäle, die durch Pregnenolonsulfat aktiviert werden können, in pankreatischen  $\beta$ -Zellen identifizieren, während  $\alpha$ -Zellen diese Kanäle nicht besitzen. Der durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Kalziumeinstrom führt zu einer vermehrten Insulinsekretion pankreatischer Inseln. Pankreatische Inseln von TRPM3-defizienten Mäusen reagieren in 3 mM Glukose dagegen nicht auf Pregnenolonsulfat mit Kalziumsignalen und auch nicht mit einer erhöhten Freisetzung von Insulin. Unsere Ergebnisse zeigen, dass TRPM3 ein essentieller Bestandteil des ionotropen Steroidrezeptors von pankreatischen  $\beta$ -Zellen ist. Wir demonstrieren somit eine, bisher unbekannte, direkte Verbindung zwischen dem Steroidhormonsystem und dem metabolischen Hormonsystem.

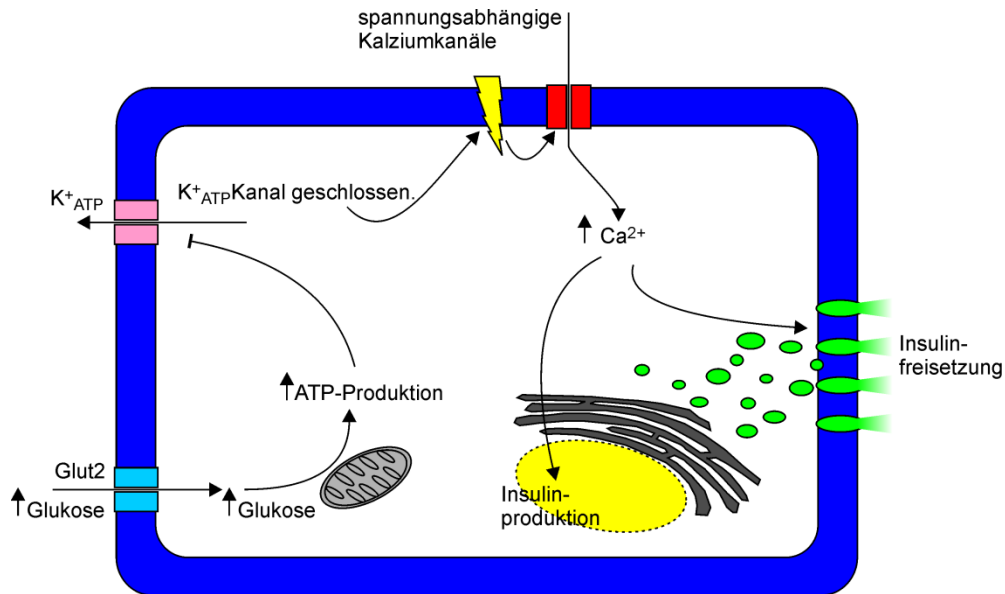
---

<sup>2</sup> Teile der in diesem Kapitel dargestellten Versuche wurden, zusammen mit Daten aus Kapitel 2, in der Publikation Wagner et al. NCB (2008) veröffentlicht [28].

## **4.1 Einleitung**

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan des exokrinen und endokrinen Systems von Vertebraten. Es bildet und sekretiert als exokrine Drüse Verdauungsenzyme, die in den Darm abgegeben werden und dort eine Rolle beim Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und Fett spielen [89]. Den endokrinen Teil des Pankreas bilden die sogenannten Langerhans-Inseln. Dabei handelt es sich um Zellkluster, die sich hauptsächlich aus vier verschiedenen Zelltypen zusammensetzen. Etwa 60 – 70 % der Inselzellen sind Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen, ungefähr 20 % sind Glukagon-produzierende  $\alpha$ -Zellen und 10 - 15 % sind Somatostatin-produzierende  $\delta$ -Zellen. Desweiteren gibt es pankreatisches Polypeptid-bildende PP-Zellen, deren Funktion bisher unbekannt ist [71]. Insulin spielt bei der Regulation des Blutzuckerspiegels eine entscheidende Rolle. Es entfaltet seine Hormonwirkung durch die Bindung an Insulinrezeptoren von Leber-, Muskel- und Fettzellen, wodurch es vielfältige Prozesse in der Zelle steuert [90, 91]. Hierzu gehören beispielsweise die Glukoseaufnahme, der Lipid- und Proteinstoffwechsel sowie die Regulation der Genexpression der dazu notwendigen Proteine. Insulin hemmt darüberhinaus die Lipolyse und fördert zudem die zelluläre Aufnahme von Fettsäuren [71, 90, 91]. Insulin wird aufgrund seiner Wirkung auch Speicherhormon des Körpers genannt.

Ein steigender Blutzuckerspiegel führt über einen sehr gut erforschten Mechanismus zu Insulinfreisetzung. Nachdem die Glukose über einen Transporter (Glut-2) in die Zelle gelangt ist, wird sie durch Glykolyse verstoffwechselt [71]. Das dabei entstehende ATP bindet an die regulatorische Untereinheit des  $K^+_{ATP}$ -Kanals und hemmt dadurch den Ausstrom von Kaliumionen [71, 92]. Durch den stark verminderten Kaliumausstrom kommt es zur Depolarisation der Zellmembran. Das depolarisierte Membranpotential bewirkt wiederum die Öffnung spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle [93, 94]. Der dadurch ausgelöste Einstrom von Kalziumionen ist der entscheidende Reiz für die Verschmelzung insulinhaltiger Vesikel mit der Zellmembran (Abbildung 4-1). Die gespeicherten Insulinmoleküle werden in den Blutkreislauf freigesetzt. Der Insulinspiegel im Blut steigt an, wodurch die Glukose aus dem Blut entfernt wird und der Blutzuckerspiegel sinkt. Die Insulinsekretion wird aber auch durch weitere



**Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der Glukose-induzierten Insulinsekretion von pankreatischen  $\beta$ -Zellen.**

Glukose dringt über den Glut2 Transporter in die Zelle ein und wird in den Mitochondrien verstoffwechselt wodurch ATP gebildet wird. Das gebildete ATP inhibiert den  $K^+_{ATP}$  Kanal, was aufgrund des dadurch unterdrückten Kaliumausstroms zur Depolarisation der Zelle führt. Dies führt wiederum durch die Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu einem starken Einstrom von Kalzium was wiederum die Fusion von insulinhaltigen Vesikeln mit der Plasmamembran und somit auch die Insulinsekretion auslöst. Außerdem wird durch die Aktivierung kalziumabhängiger Transkriptionsfaktoren die Insulin Produktion angeregt.

---

Mechanismen reguliert. Die Gastrointestinalen Hormone Gastrin, Sekretin GIP (Glucose-dependent Insulin-releasing Peptide) und GLP-1 (Glucagon-like Peptide), welche bei der Nahrungsaufnahme durch Zellen des Magen-Darm-Traktes ausgeschüttet werden, führen ebenfalls zur Insulinsekretion [71]. Sie sind dafür verantwortlich, dass bei gleicher Blutglukosekonzentration die Insulinsekretion nach oraler Aufnahme von Kohlenhydraten deutlich stärker ist als nach parenteraler Verabreichung. Es wird angenommen, dass GLP-1 der stärkste endogene Stimulator der Insulinsekretion ist [95].

Darüber hinaus wird die Insulinsekretion auch durch das vegetative Nervensystem reguliert.  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren vermitteln über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des  $G_i$ -Proteins eine Öffnung der  $K_{ATP}$ -Kanäle und hemmen dadurch die Insulinsekretion [71]. Über muskarinerge Cholinozeptoren des Typs  $M_3$  wird die Insulin-

sekretion verstärkt [71, 96].

Neben den spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanälen und dem  $K_{ATP}$ -Kanal gibt es noch weitere Ionenkanäle, die an der Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen beteiligt sein sollen. Dazu gehören spannungsabhängige Kalium-, Natrium- und Kalziumkanäle [97].

Darüber hinaus werden auch diverse TRP-Kanäle von  $\beta$ -Zellen exprimiert, die zum Teil auch funktionell nachgewiesen wurden. Dazu gehören TRPC1-, TRPC4- und TRPC6-Kanäle, deren Transkription in  $\beta$ -Zellen mit Hilfe von RT-PCR Methoden gezeigt wurde [98, 99]. Diese Kanäle können über G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden aktiviert werden [6, 7]. Pankreatische  $\beta$ -Zellen zeigen nach Stimulation mit Acetylcholin, welches über den G-Protein-gekoppelten M3-Rezeptor die Insulinfreisetzung verstärkt, TRP-ähnliche Ströme [100]. Bisher konnten diese aber nicht direkt auf die Expression eines der genannten TRPC-Kanäle zurückgeführt werden. TRPV5 könnte eine Rolle bei der Regulation der Kalziumhomöostase von  $\beta$ -Zellen spielen. Ein Hinweis darauf ist, dass bei Zucker-Ratten, die Typ-2-Diabetes entwickeln, das Fortschreiten der Erkrankung mit der Verminderung der TRPV5-Expression der  $\beta$ -Zellen korreliert [101]. Ein weiterer TRPV-Kanal, der von pankreatischen  $\beta$ -Zellen exprimiert werden soll, ist TRPV1 [102]. Es gibt aber auch Berichte, dass TRPV1 nicht in den  $\beta$ -Zellen sondern in sensorischen Nervenfasern der Langerhans-Inseln exprimiert wird [103]. Somit ist unklar, auf welche Art und Weise Capsaicin, ein Aktivator von TRPV1-Kanälen [104], die Insulinsekretion verstärkt [102, 105]. Bisher wurden mit TRPM4 [106, 107] und TRPM5 [108] zwei TRPM-Kanäle identifiziert, die in  $\beta$ -Zellen exprimiert werden. Beide werden durch intrazelluläres Kalzium aktiviert [109, 110], wodurch sie theoretisch die Insulinsekretion verstärken könnten. Während die Aktivierung von TRPM4 die Insulinsekretion tatsächlich verstärkt [106, 107], wurde für TRPM5 bisher nur die Expression auf RNA-Ebene gezeigt. TRPM5-ähnliche Ionenströme pankreatischer  $\beta$ -Zellen konnten bisher nicht eindeutig TRPM5 zugeordnet werden konnten [108].

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten belegen, dass endogene TRPM3-Kanäle pankreatischer  $\beta$ -Zellen mit Hilfe von Pregnenolonsulfat aktiviert werden kön-



### TRPM3-Kanäle verstärken die Insulinsekretion pankreatischer $\beta$ -Zellen

nen. Dadurch wurden TRPM3-Kanäle in diesen Zellen erstmals funktionell nachgewiesen. Darüber hinaus untersuchten wir, inwiefern Kalziumsignale, die durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen ausgelöst werden, die Insulinsekretion und damit die physiologische Funktion pankreatischer  $\beta$ -Zellen beeinflussen.

## **4.2 Material und Methoden**

### **4.2.1 Zellkultur**

INS1 Zellen [111] wurden in RPMI 1640 Medium (Invitrogen) mit 10 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat (Sigma Aldrich), 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercapthoethanol und 10 mM HEPES bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Pankreatische Inselzellen und pankreatische Inseln wurden im gleichen Medium (INS1 Medium) kultiviert. Manchmal enthielt dieses kein  $\beta$ -Mercapthoethanol. SH-SY5Y Zellen [112, 113] wurden in DMEM 41966 Medium (Invitrogen), das zusätzlich 15 % FKS enthielt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. MIN6 [114] wurden in DMEM 31885 Medium (Invitrogen), das zusätzlich 1 g/l Glukose, 10 % FKS und 75  $\mu$ M  $\beta$ -Mercapthoethanol enthielt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. NG108-15 Zellen [115] wurden DMEM 41965 Medium (Invitrogen welches zusätzlich 10 % FKS und 2 % HAT-Supplement (Invitrogen) enthielt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Zelllinien wurden zwei- bis dreimal pro Woche passagiert und für die Messungen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert (siehe Kapitel 2.2.1).

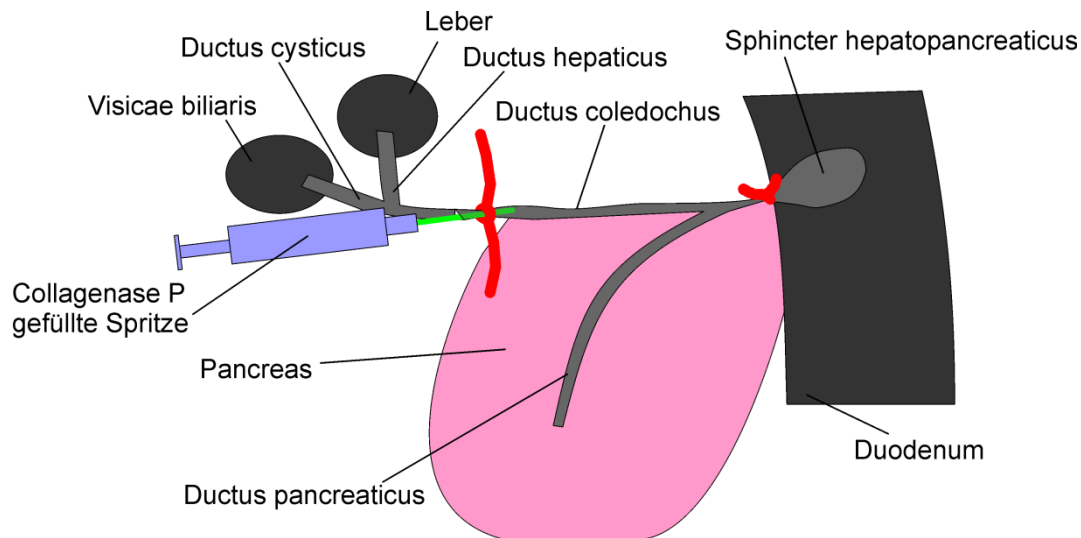
Aus dem Knochenmark von Mäusen hergestellte Mastzellen (Bone marrow derived mast cells; BMMC) wurden uns von Univ.-Prof. Dr. Marc Freichel (Experimentelle Pharmakologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt.  $\alpha$ T3-1 [116] wurden uns von Professor Dr. Gerald Thiel (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. ARPE-19 Zellen [117] wurden uns von Professor Dr. Olaf Strauß (Experimentelle Ophthalmologie, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt. Humane aktivierte und nicht aktivierte T-Zellen wurden uns von Dr. Eva Schwarz (Biophysik, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt.

### **4.2.2 Präparation und Kultivierung von Langerhans-Inseln**

Langerhans-Inseln wurden durch Collagenaseverdau des Pankreas gewonnen. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und anschließend dekapitiert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde das Pankreas freigelegt. Alle folgenden Schritte wurden unter einem Binokular (SteReo Discovery.V8, Zeiss) bei zehn-

facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurde eine Ligatur des Ductus coledochus direkt am Sphincter hepatopancreaticus durchgeführt sowie eine Schleife am Ductus coledochus gelegt (Abbildung 4-2). Der Ductus coledochus wurde zwischen der Schleife und der Vereinigung des Ductus cysticus und des Ductus hepaticus communis zum Ductus coledochus zu dreiviertel eingeschnitten. Über diesen Schnitt wurde die Spitze (Microfil MF34G-5, World Precision Instruments) der 2 ml Spritze mit kalter Collagenase P Lösung (Roche; 1,7 mg / ml in HBSS / 0,5 % BSA) in den Ductus choledochus in Richtung des Duodenums eingeführt und durch Zuziehen der Schleife fixiert. Die Collagenase P Lösung wurde vollständig in das Pankreas injiziert. Das dadurch aufgeblähte Pankreas wurde vom Darm sowie dem Magen und der Milz freipräpariert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. In diesem wurde das Pankreas ohne weitere Zugabe von Collagenase P Lösung im Wasserbad bei 37 °C für 10 - 12 Minuten unter ständigem manuellem Schütteln verdaut. Die Dauer des Verdaus ist dabei entscheidend abhängig vom verwendeten Mausstamm sowie der Qualität und der Konzentration der Collagenase P.

Der Verdau wurde durch Zugabe von 10 ml kalten HBSS welches 0.5 % BSA enthielt (HBSS / BSA) abgestoppt, anschließend mit einer serologischen 10 ml Pipette vorsichtig tituiert und danach mit 900 g (Rotanda / K, Hettich) kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml HBSS / BSA aufgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zellsuspension wurde danach auf zwei geschwärzte Petrischalen, die mit kaltem HBSS / BSA gefüllt wurden, aufgeteilt. Die Langerhans-Inseln waren auf dem schwarzen Hintergrund deutlich vom sehr feinen exokrinen Gewebe zu unterscheiden und wurden mit einer 200  $\mu$ l Pipette gesammelt und in eine frische, ebenfalls geschwärzte, HBSS / BSA gefüllte Petrischale überführt. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die Inseln vom exokrinen Gewebe vollständig befreit waren. Für Experimente mit intakten Inseln, wurden die Inseln in einem 15 ml Röhrchen mit 10 ml HBSS gesammelt, zentrifugiert (für eine Minute bei 200 - 400 g und der Überstand bis auf 30 - 50  $\mu$ l abgenommen. Die Inseln wurden mit einer 200  $\mu$ l Pipette vorsichtig resuspendiert und vollständig auf ein mit 0.1 % Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen gegeben. Um die Inseln zu



**Abbildung 4-2 Schematische Darstellung der Präparation pankreatischer Inseln.**

In rot sind die Ligaturen eingezeichnet. Die mit kalter Collagenase P Lösung gefüllte Spritze wird wie eingezeichnet in den Ductus coledochus eingeführt und durch Zuziehen der Schleife fixiert.

---

Inselzellen zu vereinzeln wurden sie in ein 15 ml Röhrchen überführt, das zuvor mit 10 ml divalentfreiem DPBS (Invitrogen) gefüllt wurde. Die Inseln wurden daraufhin für eine Minute bei 200 - 400 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Die Inseln wurden in 10 ml divalentfreiem DPBS, welches 1 ‰ 10xTrypsin-EGTA-Lösung (Sigma Aldrich) enthielt, aufgenommen und zwei Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden sie wie zuvor zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Die immer noch intakten Inseln wurden in 5 ml INS1 Medium aufgenommen und mit einer Pasteurpipette tituiert bis keine Inseln mehr sichtbar waren. Die Inselzellen wurden für eine Minute bei 200 - 400 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig bis auf ~ 250  $\mu$ l abgenommen und die Zellen im Rest resuspendiert. Jeweils ein Tropfen der Zellsuspension wurde auf ein Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen gegeben. So konnten aus einer Präparation 6 - 10 Deckgläschen mit hoher Zelldichte gewonnen werden. Die Schälchen mit den Inseln beziehungsweise vereinzelter Inselzellen wurden in den Brutschrank überführt und erst dort mit 2 ml Medium vorsichtig überschichtet um die Inseln und Inselzellen so wenig wie möglich zu bewegen.

#### **4.2.3 Fluorometrische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration**

Die fluorometrischen Messungen zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben durchgeführt. INS1 Zellen und pankreatische Inselzellen wurden für 30 Minuten mit 2.5  $\mu$ M Fura-2-AM im Medium bei Raumtemperatur geladen. Langerhans-Inseln wurden mit 5  $\mu$ M Fura-2-AM für 45 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur und im Medium inkubiert.

Alle in Abbildung 4-3 gezeigten Experimente sowie Experimente mit Inselzellen, denen sich eine Antikörperfärbung anschloss (Abbildung 4-4d), wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendete Badlösung enthielt (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 5 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES und 10 Mannitol. Der pH-Wert wurde mit 2 M CsOH auf 7,2 eingestellt, wodurch die Lösung zusätzlich 2 - 3 mM CsOH enthielt. Die Osmolalität betrug zwischen 310 und 320 mosmol / kg.

Für die Messungen mit intakten Langerhans-Inseln in Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7b sowie vereinzelter Inselzellen (Abbildung 4-7b) wurden folgende Lösungen verwendet. Die Badlösung enthielt (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2.5  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES und zusätzlich 5 oder 20 Glukose. Die 40-mM-kaliumhaltige Lösung enthielt (in mM): 105 NaCl, 40 KCl, 2,5  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 5 Glukose. Der pH-Wert wurde in beiden Fällen mit 2 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Osmolalität beider Lösungen betrug etwa 310 mosmol / kg. Lösungen, die Pregnenolonsulfat, Nifedipin oder Verapamil enthielten, wurden durch Zugabe einer Stocklösung (je 50 mM in DMSO) zur jeweiligen Lösung hergestellt. Alle Messungen mit ganzen Inseln wurden zudem bei 37 °C durchgeführt. Hierzu wurde die bereits beschriebene Apparatur verwendet (Kapitel 2.2.2).

Die in Abbildung 4-5 und Abbildung 4-7c sowie in Abbildung 4-10 gezeigten Experimente wurden ebenfalls bei 37 °C jedoch mit einer Bicarbonat / HEPES gepufferten Ringerlösung durchgeführt, die während des Experiments mit Carbogen (95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , Linde) begast wurde. Diese enthielt in mM: 120 NaCl, 4.8 KCl, 2.5  $\text{CaCl}_2$ , 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 24  $\text{NaHCO}_3$ , 2 - 3 NaOH. Der pH-Wert wurde nach zehnminütiger Begasung mit Carbogengas durch Zu-

gabe von 2 M NaOH auf 7.4 eingestellt. Die Glukose (3 mM, 5 mM, 10 mM oder 20 mM) ebenso wie 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat (aus 50 mM DMSO-Stocklösung) wurden dieser Basislösung entsprechend zugesetzt. Osmotische Unterschiede dieser Lösungen wurden nicht kompensiert.

#### **4.2.4 Immunohistochemische Experimente**

Für alle immunohistochemischen Experimente wurden die Zellen auf „etched Grid“ Deckgläschen (Belco) kultiviert (siehe auch Kapitel 3.2). Alle fluorometrischen Kalziummessungen, an die sich eine immunohistochemische Färbung anschloss, wurden in einem Deckgläschenhalter (Molecular Probes) durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Laden mit dem Fura-2-AM Farbstoff dreimalig mit der Badlösung gewaschen, in den Deckgläschenhalter eingespannt und mit 500  $\mu$ l Badlösung überschichtet. Der für die Messung gewählte Bildausschnitt wurde im Durchlicht mit dem 10x SFluor Objektiv (Nikon), mit dem auch die fluorometrischen Kalziummessungen durchgeführt wurden, fotografiert und somit die genaue Position und Ausrichtung des „etched grid“ Deckglases auf dem Mikroskop festgehalten. Dann wurden die Kalziumsignale gemessen und dabei die Zellen mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die Applikation des Pregnenolonsulfats erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 500  $\mu$ l einer 70  $\mu$ M Pregnenolonsulfatlösung. Dadurch wurde Pregnenolonsulfat in einer Konzentration von 35  $\mu$ M appliziert. Die Applikation von Pregnenolonsulfat wurde durch mehrmalige Verdünnung mit Badlösung beendet.

Nach Beendigung der Messung des Kalziumsignals wurde das „etched grid“ Deckgläschen in eine Zellkulturschale überführt und die Zellen für fünf Minuten mit 10 % Formaldehyd in TBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal für je eine Minute mit TBS gewaschen und anschließend mit 0.1 % Triton X100 (Sigma Aldrich) / TBS fünf Minuten lang permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden wiederum dreimal für je eine Minute mit TBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen anschließend durch eine einstündige Inkubation mit 5 % BSA / TBS blockiert.

Die so behandelten Inselzellen wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler gleichzeitig mit primären Antikörpern gegen Insulin (Dako 1:2000) und Gluka-

gon (Sigma 1:2000) in 1 % BSA / TBS inkubiert. Die Zweitantikörper (Anti rabbit Alexa Fluor 488 und Anti mouse Alexa Fluor 594 je 1:1000, Invitrogen) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur ebenfalls in 1 % BSA / TBS unter Schütteln inkubiert. Der Zweitantikörper (Anti rabbit Alexa Fluor 488 1:1000, Invitrogen) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefärbten Deckgläser wurden mit Hilfe des auf das Deckglas geätzten Gitters manuell ausgerichtet und mit den passenden Filtern (Alexa Fluor 488 Fluoreszenz: Anregungsfilter D480/30, Emissionsfilter D535/40, dichroischer Spiegel Q505 LP, Alexa Fluor 594 Fluoreszenz Anregungsfilter 560/40, Emissionsfilter B630/60, dichroischer Spiegel DM 595; alle AHF Analysentechnik) fotografiert. Die Fotos wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben mit Hilfe von ImageJ gedreht, verschoben und zugeschnitten, um eine perfekte Überlagerung zwischen den Kalziumexperimenten und den Fotos der immunhistochemischen Färbungen zu erlangen.

#### **4.2.5 Zeitlich aufgelöste Insulinfreisetzung aus Langerhans-Inseln**

Isolierte Langerhans-Inseln wurden über Nacht in INS1 Medium kultiviert. Um die Insulinfreisetzung zeitlich aufzulösen und mit dem Kalziumsignal zu korrelieren, wurden 12 - 100 Inseln mit Fura-2 für 45 Minuten geladen und in eine beheizte Perfusionsplattform (Warner Instruments) mit einem Volumen von ungefähr 360  $\mu$ l überführt. Die Perfusionsrate wurde mit einer peristaltischen Pumpe (Medorex) bei etwa 300  $\mu$ l / min gehalten und vor sowie nach jedem Experiment bestimmt. Der Mittelwert der Perfusionsrate vor und nach jedem Experiment wurde dann für die weitere Berechnung der Insulinsekretion / Insel / Minute verwendet. Während des gesamten Experiments wurde die Änderung der Kalziumkonzentration anhand des Fura-2-Signals von 1 - 6 ganzen Inseln mit einer Frequenz von 0.2 Hz verfolgt. Alle Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt. Hierfür wurde ein Durchlauferhitzer für das Perfusat sowie eine Heizung für die Perfusionsplattform (beides Warner Instruments) verwendet. Die verwendeten Badlösungen wurden bereits oben beschrieben (Kapitel 4.2.3), wobei bei allen in Abbildung 4-6 gezeigten Versuchen die Lösung zusätzlich 0.05 % BSA enthielt. Die Perfusatfraktionen wurden minutenweise am Auslauf der

Perfusionskammer in 1.5 ml Reaktionsgefäßen mit 300  $\mu$ l des im Experiments verwendeten Puffers, der zusätzlich 1 % BSA enthielt, aufgenommen, wobei die vorgelegte BSA-Lösung der Stabilisierung des Insulins diene. Die Fraktionen wurden auf Eis gesammelt und in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (z233MK, HERMLE) zehn Minuten bei 1840 g zentrifugiert. Von den Überständen der einzelnen Fraktionen wurde die Insulinkonzentration mittels ELISA (DRG, Marburg, Deutschland) nach Herstelleranweisung bestimmt. Nach jedem Experiment wurde die genaue Anzahl der Inseln, die zur Insulinfreisetzung beitrugen, bestimmt. Die Insulinkonzentration wurde in Insulinfreisetzung / Minute / Insel angegeben. Alle Experimente mit TRPM3-defizienten Tieren wurden als Doppelblindstudie mit 3 - 4 Monate alten männlichen Tieren durchgeführt. Alle Tiere stammten aus TRPM3<sup>+/-</sup> Auskreuzungen, wobei TRPM3<sup>+/+</sup> Wurfgeschwister als Kontrolle dienten.

#### **4.2.6 Patch-Clamp Experimente**

##### **Durchführung**

Es wurden Gigaseal, Spannungsklemme Experimente mit dem bereits in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Messstand und Protokoll durchgeführt. Als Pipettenlösung und extrazelluläre Lösung wurden ebenfalls die dort beschriebenen Lösungen verwendet. Extrazellulärlösungen mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat oder 50  $\mu$ M Nifedipin wurden durch Zugabe der jeweiligen Stocklösung (je 50 mM in DMSO) hergestellt, so dass die DMSO-Konzentration 1 ‰ nicht überschritt. Alle Lösungen wurden lokal über das bereits zuvor beschriebene (Kapitel 2.2) gravitationsbetriebene Perfusionssystem, dessen Ausgang weniger als 200  $\mu$ m vor der gemessenen Zelle platziert wurde, appliziert. Vereinzelte Inselzellen von Wildtyp und TRPM3-defizienten Mäusen wurden wie beschrieben gewonnen und einen Tag nach der Präparation gemessen.

##### **Analyse der Daten**

Alle Potentialwerte wurden bei der Auswertung um ein Liquid junction potential von -15 mV korrigiert. Die Stromentwicklung der Zellen über die Zeit wurde für den Einwärtsstrom bei - 80 mV und + 80 mV (korrigiert) für den Auswärtsstrom



ausgewertet. Die Analyse der Daten erfolgte mit Igor Pro 5.0.1.0 (Wavemetrics Inc.) unter Zuhilfenahme des „Patcher's Power Tools“ Plugins (Version 2.12; Department of Membrane Biophysics at MPI Biophysical Chemistry in Göttingen, Germany), Excel 2003 (Microsoft Inc.) und Origin 7.0 (Originlab Corporation). Ausgewertet wurde die mittlere durch die Applikation von Pregnenolonsulfat oder Nifedipin ausgelöste Änderung des Stroms bei + 80 mV und - 80 mV von Zellen aus TRPM3<sup>-/-</sup> Tieren gegenüber Zellen der Kontrollgruppe.

#### **4.2.7 Statistische Analyse**

Es wurden gepaarte und ungepaarte t-Test Analysen nach Student zur Ermittlung statistischer Unterschiede durchgeführt. p-Werte von  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

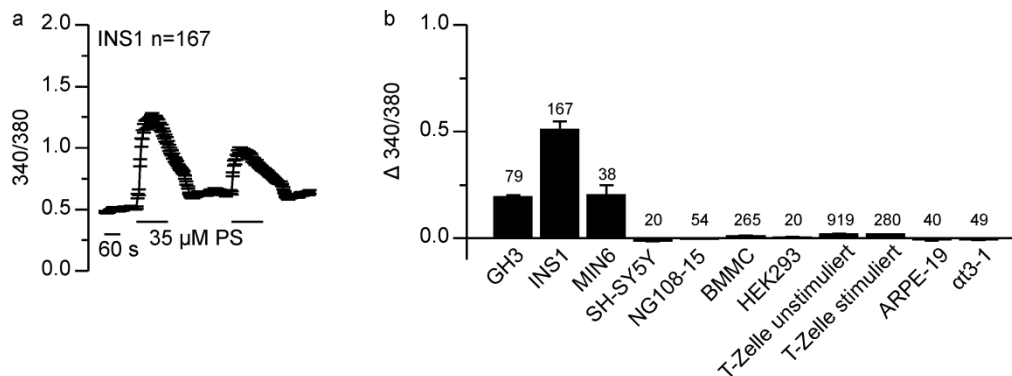
#### **4.2.8 Genetisch veränderte Mauslinien**

Die TRPM3<sup>-/-</sup> Mäuse [76] wurden uns von PD Dr. Stephan Philipp (Allgemeine und Klinische Pharmakologie, Universität des Saarlandes) und Prof. Dr. Marc Freichel (Experimentelle Pharmakologie, Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

Mäuse denen  $\beta$ -Zell-spezifisch der Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal [118] fehlt, wurden uns von Professor, Dr. med., Emeritus Franz Bernhard Hofmann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Pregnenolonsulfat erhöht die Kalziumkonzentration von INS1 und MIN6 Zellen



**Abbildung 4-3 Die  $\beta$ -Zelllinien INS1 und MIN6 reagieren auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration**

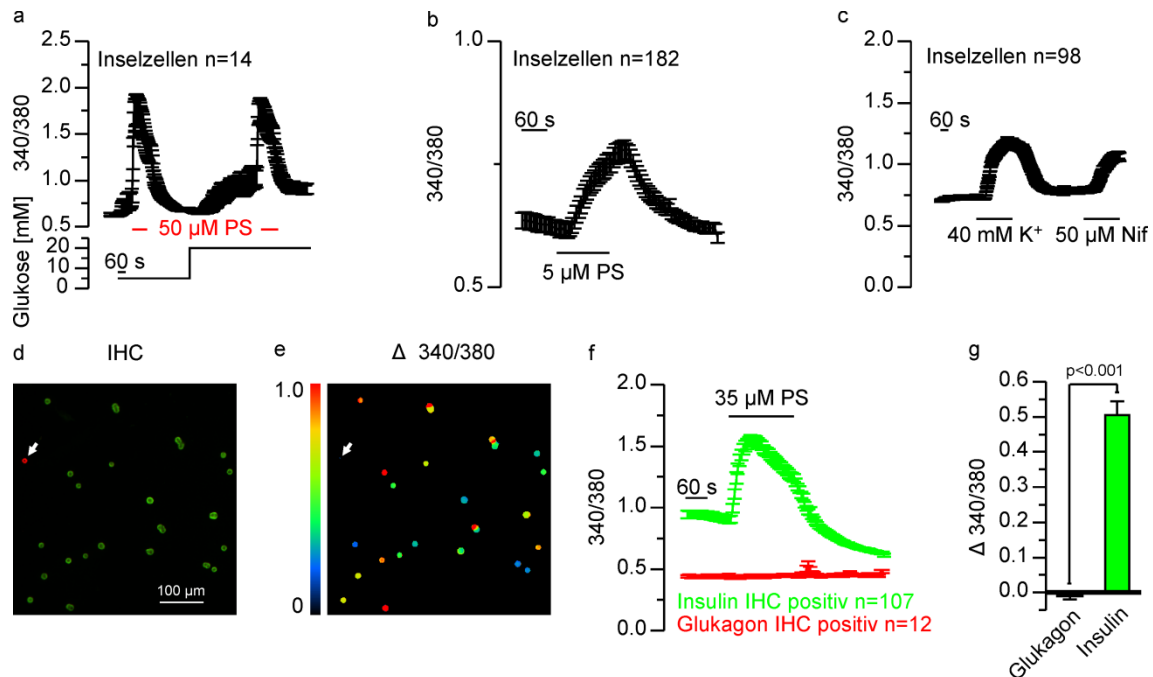
(a) Verlauf der mittleren Fura-2 Fluoreszenz von 167 INS1 Zellen. Pregnenolonsulfat wurde der Badlösung zu den eingezeichneten Zeiten zugesetzt und führte zu einem raschen und reversiblen Anstieg des Fura-2-Signals. (b) Durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Änderung des Fura-2-Signals von diversen Zelllinien. Neben GH3 Zellen antworteten auch die  $\beta$ -Zelllinien INS1 und MIN6 auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg des Fura-2-Signals. Alle anderen getesteten Zelllinien und Zellen in Primärkultur reagierten nicht auf die Zugabe von Pregnenolonsulfat. Die Zahlen über den jeweiligen Balken repräsentieren die Anzahl der ausgewerteten Einzelzellen. Daten für GH3-Zellen wurden aus Kapitel 3 übernommen.

Bei Hypophysenzellen führt die Aktivierung endogen exprimierter TRPM3-Kanäle durch Pregnenolonsulfat zu robusten Kalziumsignalen (Kapitel 3). Wir testeten daher weitere Zelllinien und auch Primärzellen mit Hilfe von fluorometrischen Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration auf Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignale. Während die Neuroblastoma Zelllinien SH-SY5Y [112, 113] und NG108/15 [115], die humane Zelllinie des Pigmentepithels der Retina ARPE19 [117] und die gonadotrophe Hypophysenzelllinie  $\alpha$ T3-1 [116], sowie die aus dem Knochenmark von Mäusen generierten Mastzellen (BMMC) und humane aktivierte sowie nicht aktivierte T-Zellen nicht auf die Applikation von Pregnenolonsulfat reagierten, war es umso erfreulicher,

dass die Ratteninsulinomazelllinie INS1 [111] auf Pregnenolonsulfat mit einem starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antwortete (Abbildung 4-3a, b). INS1 Zellen reagierten auf die Applikation von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einem schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Nachdem eine maximale Aktivierung erreicht wurde, sank bei weiterer Stimulation mit Pregnenolonsulfat das Kalziumsignal wieder (Abbildung 4-3a). Dies konnte zuvor bei mit TRPM3 transfizierten HEK293 Zellen nicht beobachtet werden (Abbildung 2-3). Nach Wegnahme des Pregnenolonsulfatstimulus fiel das Fura-2-Signal der Zellen schnell wieder auf Basisniveau. Die Tatsache, dass wir auch bei der Maus Insulinomazelllinie MIN6 [114], Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignale messen konnten, bestärkte uns in der Annahme, dass Pregnenolonsulfat-aktivierte, TRPM3-ähnliche Kalziumkanäle auch von primären pankreatischen Inselzellen exprimiert werden (Abbildung 4-3b).

#### **4.3.2 Pregnenolonsulfat erhöht die Kalziumkonzentration von $\beta$ -Zellen, nicht aber die von $\alpha$ -Zellen.**

Um fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration von Zellen des endokrinen Pankreas durchzuführen, wurde die Präparation und Kultivierung pankreatischer Inseln und einzelner Inselzellen von Mäusen etabliert. Auch diese akut isolierten pankreatischen Inselzellen reagierten auf 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einem raschen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abbildung 4-4a). Wie bei den Versuchen mit INS1 Zellen fiel dieses Signal bei längerer Applikation von Pregnenolonsulfat stetig ab. Nach Entfernung von Pregnenolonsulfat aus der Perfusionslösung fiel das mittlere Fura-2-Signal der Zellen wieder auf das Niveau, das sie vor Stimulation mit Pregnenolonsulfat besaßen. Danach reagierten die Zellen auf eine Erhöhung der Glukosekonzentration der Perfusionslösung von 5 mM auf 20 mM mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies zeigte, dass die Zellen, auch nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat, nicht in ihrer physiologischen Funktionsweise beeinträchtigt waren. Das Glukose-induzierte Kalziumsignal der vereinzelter Zellen wurde durch die Zugabe von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat weiter erhöht. Die bei den bisherigen Experimenten für die Stimulation von



**Abbildung 4-4 Pregnenolonsulfat erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration von pankreatischen  $\beta$ -Zellen.**

(a-c) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von vereinzelteten Inselzellen. (a) Pregnenolonsulfat wurde zu den angegebenen Zeiten appliziert. Die Glukosekonzentration der Perfusionslösung ist im unteren Abschnitt gezeigt. (b, c) Die Glukosekonzentration betrug stets 5 mM. (b) 5  $\mu$ M Pregnenolonsulfat wurde der Perfusionslösung wie angegeben zugesetzt. (c) Der Wechsel auf eine 40-mM-kaliumhaltige Lösung erfolgte wie in der Abbildung gezeigt. Nifedipin wurde zum angegebenen Zeitraum der Perfusionslösung zugefügt. (d) und (e) Beispiel für die in (f) zusammengefassten Experimente. (d) zeigt das Ergebnis der immunohistochemischen Färbung auf Glukagon (rot) und Insulin (grün), die im Anschluss an die Messung der, durch zweiminütige Applikation von Pregnenolonsulfat ausgelösten, Änderung des Fura-2-Signals (g, farbkodiert), durchgeführt wurde. (f) Verlauf des Fura-2-Signals von 107 Insulin-immunoreaktiven Zellen (grüne Spur) und 12 Glukagon-immunoreaktiven Zellen (rote Spur). 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat wurde wie angegeben zugegeben. (g) statistische Auswertung der in f dargestellten Ergebnisse. Die Balken repräsentieren die mittlere Zunahme des Fura-2-Signals 2 Minuten nach der Applikation von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat. Die Zunahme des Fura-2-Signals Insulin-produzierender Zellen (n=107) war signifikant größer ( $p < 0.001$ ) als die von Glukagon-bildenden Zellen (n=12), deren Fura-2-Signal nicht durch Pregnenolonsulfat verändert wurde.

pankreatischen Inselzellen verwendeten Pregnenolonsulfatkonzentrationen lagen deutlich über den im menschlichen Körper nachgewiesenen Konzentrationen von maximal 5  $\mu$ M Pregnenolonsulfat [80, 83-86]. Wir konnten aber

zeigen, dass bereits eine Konzentration von 5  $\mu$ M Pregnenolonsulfat ausreichte, um zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration einzelner Inselzellen zu führen (Abbildung 4-4b).

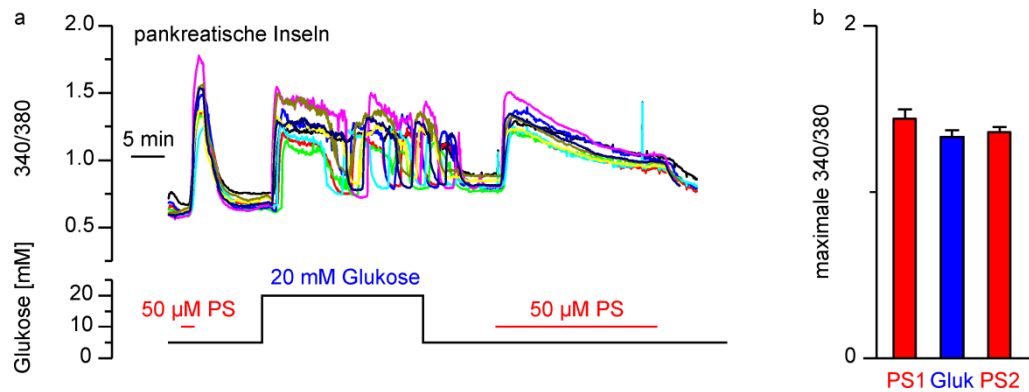
Neben der Aktivierbarkeit durch Pregnenolonsulfat ist auch die Aktivierung durch Nifedipin eine wichtige pharmakologische Eigenschaft von TRPM3-Kanälen [46, 61] (Kapitel 2). Mit fluorometrischen Kalziummessungen konnten wir zeigen, dass pankreatische Inselzellen auf die Zugabe von 50  $\mu$ M Nifedipin mit einem schnellen Anstieg des Fura-2-Signals reagierten (Abbildung 4-4c). Pankreatische Inselzellen antworteten also auf genau die pharmakologischen Stimuli mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, die bereits heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle aktivierten. Daher vermittelten mit hoher Wahrscheinlichkeit endogen exprimierte TRPM3-Kanäle die Pregnenolonsulfat und Nifedipin induzierten Kalziumsignale pankreatischer Inselzellen.

Nicht alle der akut isolierten pankreatischen Inselzellen reagierten auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Hier stellte sich, wie bereits zuvor bei den Experimenten mit Hypophysenzellen (Kapitel 3), die Frage, ob Pregnenolonsulfat-sensitive Kanäle nur von einem bestimmten Inselzelltyp exprimiert wurden. Um diese Frage zu beantworten, wurden die vereinzelter pankreatischen Inselzellen, wie zuvor schon die Hypophysenzellen (Kapitel 3), auf etched-grid Deckgläsern kultiviert, was das spätere Wiederauffinden der Zellen möglich machte. Die durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumsignale der einzelnen Zellen wurden jeweils am nächsten Tag in fluorometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 aufgezeichnet. Von den 123 im Verlauf dieser Experimente untersuchten Zellen reagierten 106 auf die Zugabe von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, was auf die Expression endogener TRPM3-Kanäle in diesen Zellen schließen ließ. Anschließend wurden alle Zellen immunohistochemisch auf Insulin und Glukagon gefärbt und somit die zwei häufigsten Inselzelltypen, nämlich Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen und Glukagon produzierende  $\alpha$ -Zellen, identifiziert. Von den untersuchten Zellen waren 107 immunoreaktiv auf Insulin und 12 immunoreaktiv auf Glukagon. Die Färbungen wurden später mit den zuvor gemessenen Kalziumsignalen verglichen. Ein solches Experiment ist in

Abbildung 4-4d und e dargestellt. Während alle in Grün dargestellten Insulin-gefärbten Zellen (Abbildung 4-4d) zuvor auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg des Fura-2-Signals (Abbildung 4-4e) geantwortet hatten, reagierte die mit einem Pfeil gekennzeichnete und in Rot dargestellte Glukagon-gefärbte Zelle (Abbildung 4-4d) als einzige nicht auf Pregnenolonsulfat (Abbildung 4-4e). Die Auswertung dieser Experimente zeigte, dass alle Zellen, die auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antworteten, Insulin-produzierende  $\beta$ -Zellen waren, während keine der Glukagon-positiven  $\alpha$ -Zellen auf Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierte. Dies wurde umso deutlicher, wenn man den zeitlichen Verlauf des mittleren Fura-2-Signals aller Insulin-gefärbten Zellen und Glukagon-gefärbten Zellen verglich (Abbildung 4-4f). Während das Kalziumsignal der Insulin-positiven Zellen (grüne Spur) nach der Zugabe von 35  $\mu$ M Pregnenolonsulfat deutlich anstieg, führte dies zu keiner Änderung des mittleren Fura-2-Signals der Glukagon-positiven Zellen (rote Spur). In Abbildung 4-4g ist die Pregnenolonsulfat-induzierte Änderung des Fura-2-Signals von Glukagon-positiven und Insulin-positiven Zellen in Form eines Balkendiagrammes zusammengefasst. Die Pregnenolonsulfat-induzierte Änderung des Fura-2-Signals der Insulin-positiven Zellen war signifikant größer als die der Glukagon-gefärbten Zellen.

#### **4.3.3 Pregnenolonsulfat erhöht die Kalziumkonzentration von Langerhans-Inseln und verstärkt die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung**

In einer pankreatischen Insel sind die einzelnen  $\beta$ -Zellen untereinander elektrisch vernetzt, wodurch die Stimulation durch Glukose zu synchronen Oszillationen der Kalziumkonzentration aller  $\beta$ -Zellen einer Insel führt [119]. Um zu untersuchen, ob die Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignale pankreatischer  $\beta$ -Zellen ausreichend sind, um auch die Insulinsekretion zu verstärken, wurden intakte pankreatische Inseln auf Deckgläschen kultiviert und am nächsten Tag fluorometrische Kalziummessungen dieser Inseln durchgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente konnten wir zeigen, dass die in der Insel durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumsignale vergleichbar hoch waren wie die



**Abbildung 4-5 Die durch 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 20 mM Glukose ausgelösten Kalziumsignale von ganzen Langerhans-Inseln sind vergleichbar groß.**

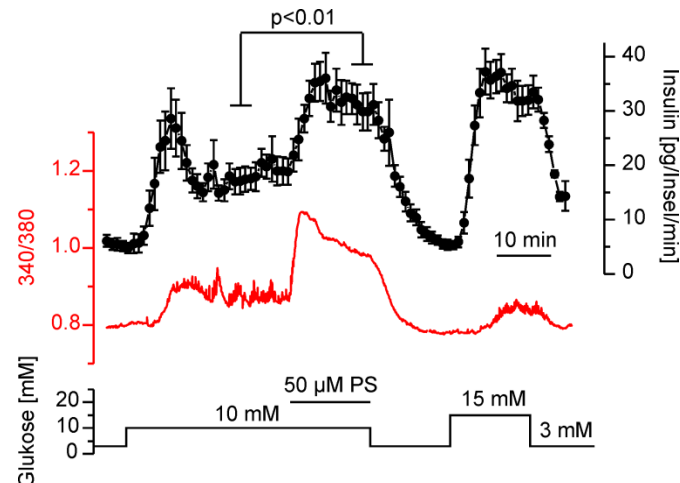
(a) Verlauf der Fura-2-Signale von neun Inseln. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und verschiedene Glukosekonzentrationen wurden wie angegeben appliziert. (b) Quantitative Analyse der maximal erreichten Fura-2-Signale der in a gezeigten Experimente, während der ersten und zweiten Applikation von Pregnenolonsulfat sowie während der Applikation von 20 mM Glukose.

---

durch die Erhöhung der Glukosekonzentration erreichten Kalziumsignale (Abbildung 4-5a, b). Während die Applikation von 20 mM Glukose oszillierende Kalziumsignale auslöste, führte die Stimulation mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat zu einem initial hohen Anstieg der Kalziumkonzentration, der mit der Zeit langsam aber ohne Oszillationen abfiel (Abbildung 4-5a).

Das Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignal ganzer Inseln ähnelte somit stark dem bereits bei INS1 und auch vereinzelt  $\beta$ -Zellen beobachteten Signal. Ein Unterschied zwischen den durch Glukose und Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumantworten war, dass Pregnenolonsulfat direkt nach Applikation und bei allen Inseln gleichzeitig zu einer raschen Erhöhung des Fura-2-Signals führte, während die Kalziumkonzentration nach der Erhöhung der Glukosekonzentration erst mehrere Minuten und nicht bei allen Inseln gleichzeitig anstieg. Ebenso fiel das Fura-2-Signal der Inseln sofort nach Entfernung von Pregnenolonsulfat aus der Perfusionslösung stark ab, während die Oszillationen des Fura-2-Signals noch Minuten nach der Reduktion der Glukosekonzentration anhielten.

Die Erhöhung der Glukosekonzentration führt bei pankreatischen Inseln über die dadurch ausgelöste Erhöhung der Kalziumkonzentration in den  $\beta$ -Zellen zur



**Abbildung 4-6 Pregnenolonsulfat verstärkt die Insulinsekretion von pankreatischen Inseln.**

Das Fura-2-Signal und die Insulinsekretion pankreatischer Inseln wurden gleichzeitig aufgenommen. Lösungen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen und mit oder ohne 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat wurden wie angegeben appliziert. In schwarz ist die mittlere Insulinfreisetzung von fünf verschiedenen Experimenten mit je 20 - 76 Inseln und insgesamt 240 Inseln aufgetragen. Das Fura-2-Signal einer repräsentativen einzelnen Insel aus einem dieser Experimente ist in rot dargestellt. Die Zugabe von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat erhöhte die Insulinfreisetzung der Inseln in 10 mM Glukose um  $82 \pm 16 \%$ .

---

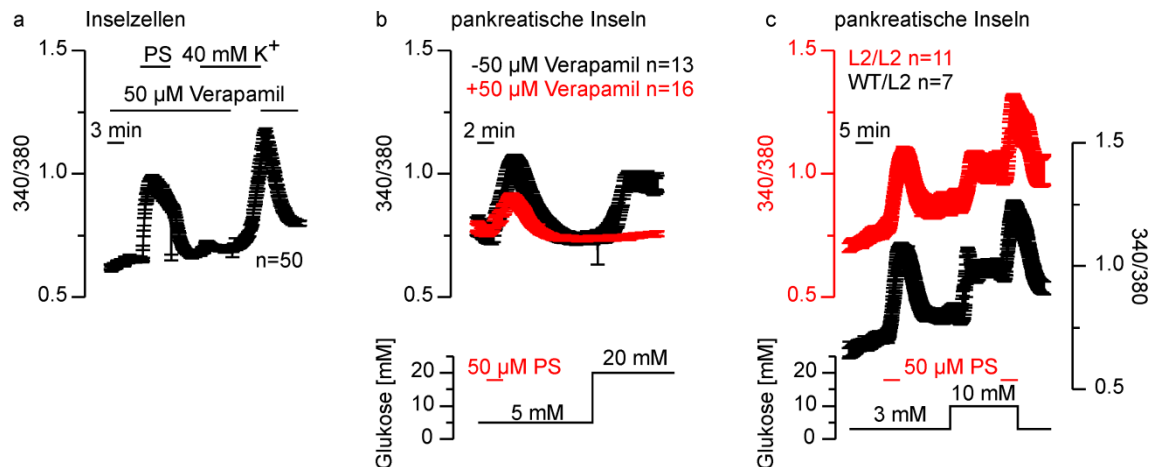
Freisetzung von Insulin. Wir untersuchten, ob die durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumsignale pankreatischer Inseln die Glukose-induzierte Freisetzung von Insulin verstärkt. Während der Durchführung von Perfusionsexperimenten mit konstanter Perfusionsrate von  $\sim 300 \mu\text{l} / \text{min}$  wurde die Insulinfreisetzung von pankreatischen Inseln, die auf einem Deckglas kultiviert wurden, gemessen. Hierfür wurde jede Minute eine Perfusatfraktion gesammelt und die Insulinkonzentration der einzelnen Fraktionen mittels ELISA bestimmt. Der zeitliche Verlauf der mittleren Insulinkonzentration aller so durchgeführten Experimente ist in Abbildung 4-6 als Insulinfreisetzung in  $\text{pg} / \text{min} / \text{Insel}$  (schwarze Spur) dargestellt. Gleichzeitig wurde während dieser Experimente der zeitliche Verlauf der Kalziumkonzentration einiger Inseln gemessen. In Abbildung 4-6 ist der zeitliche Verlauf der Kalziumkonzentration (rote Spur) exemplarisch für eine Insel dargestellt. Dies erlaubte es, die Kalziumsignale der Inseln mit der Insulinfreisetzung zeitlich zu korrelieren. Die Inseln antworteten auf die Erhö-



hung der Glukosekonzentration in der Perfusionslösung von 3 mM auf 10 mM mit einem transienten Anstieg der Insulinfreisetzung, der sich nach etwa zehn Minuten auf einem stabilen Niveau einpendelte und mit dem gemessenen Kalziumsignal der einzelnen Inseln zeitlich sehr gut korrelierte. Die Zugabe von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat führte unter diesen Bedingungen zu einem weiteren starken Anstieg der intrazelluläre Kalziumkonzentration, was einen starken Anstieg der Insulinfreisetzung auf ungefähr das doppelte des Ausgangswerts bei 10 mM Glukose zur Folge hatte. Auch wenn nach längerer Pregnenolonsulfatapplikation das Kalziumsignal und die Insulinfreisetzung abnahmen, so war die Insulinsekretion weiterhin um 82  $\pm$  16 % gegenüber der Insulinsekretion vor der Zugabe von Pregnenolonsulfat erhöht. Wurde nun Pregnenolonsulfat aus der Perfusionslösung wieder entfernt und die Glukosekonzentration auf 3 mM zurückgesetzt, so verringerte sich das Kalziumsignal und die Insulinfreisetzung ging auf den Basalwert zurück. Im Anschluss reagierten die Inseln wiederum auf die Erhöhung der Glukosekonzentration von 3 mM auf 15 mM. Dies zeigte, dass die Inseln auch nach der Behandlung mit Pregnenolonsulfat intakt waren. Wir konnten mit diesem Experiment zeigen, dass Pregnenolonsulfat die Insulinsekretion pankreatischer Inseln schnell und reversibel beeinflussen kann, und dass die Inseln auch nach einer Behandlung mit Pregnenolonsulfat funktionsfähig bleiben.

#### **4.3.4 Pregnenolonsulfat induzierte Kalziumsignale sind unabhängig von $\text{Ca}_v1.2$ Kanälen**

Die durch Depolarisation der Zelle ausgelöste Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und insbesondere solcher des Typs  $\text{Ca}_v1.2$  [118, 120] führt in pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration. Es ist zu erwarten, dass auch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch Pregnenolonsulfat zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Es stellte sich deshalb die Frage, zu welchem Grad spannungsabhängige Kalziumkanäle am durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt waren. Daher untersuchten wir, ob das durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Kalziumsignal pankreatischer Zellen und



**Abbildung 4-7 Pregnenolonsulfat induzierte Kalziumsignale sind unabhängig von spannungsabhängigen Kalziumkanälen.**

(a) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von 50 pankreatischen Inselzellen. Verapamil und Pregnenolonsulfat wurden der Perfusionslösung wie angegeben zugegeben. Der Wechsel der Perfusionslösung von Standardlösung auf die 40-mM-kaliumhaltige Lösung erfolgte wie angegeben. (b) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von intakten pankreatischen Inseln. Lösungen mit 5 mM und 20 mM Glukose und 50 µM Pregnenolonsulfat wurden wie angegeben appliziert. In der blauen Spur befand sich zusätzlich 50 µM Verapamil in der Perfusionslösung. (c) Verlauf des mittleren Fura-2-Signals von 7 pankreatischen Inseln von insgesamt 3 WT/L2 Mäusen (schwarze Spur) und 11 Inseln von 3 L2/L2 Mäusen. Perfusionslösungen mit 3 mM oder 10 mM Glukose, die 50 µM Pregnenolonsulfat oder kein Pregnenolonsulfat enthielten, wurden zu den angezeigten Zeitpunkten appliziert.

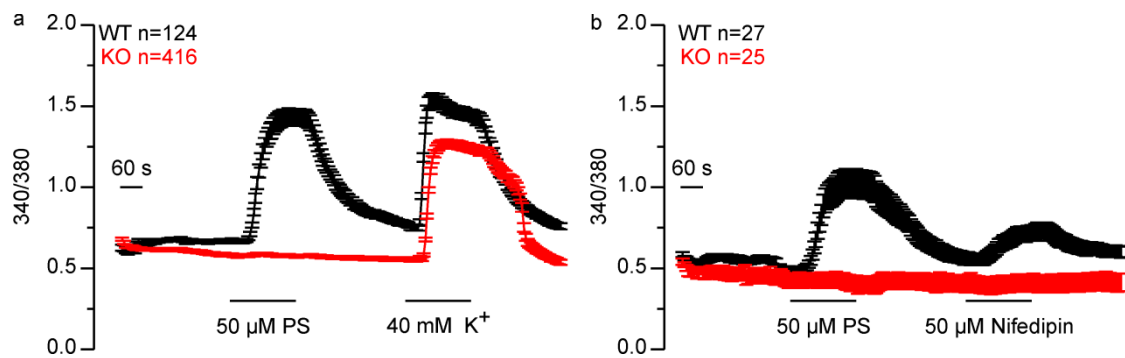
Inseln durch die Inhibition spannungsabhängiger Ca<sub>v</sub>1.2 Kanäle verändert wird. Hierzu fügten wir der Perfusionslösung 50 µM Verapamil zu. Dieser Blocker von L-Typ Kalziumkanälen inhibiert in dieser hohen Konzentration auch andere spannungsabhängige Kalziumkanäle [121, 122], jedoch nicht TRPM3 (Kapitel 2.3.2). Wir konnten zeigen, dass vereinzelte Inselzellen auch in Anwesenheit von 50 µM Verapamil deutlich auf 50 µM Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antworteten (Abbildung 4-7a). Die Depolarisation der Zellen durch eine 40-mM-kaliumhaltige Lösung führte dagegen unter 50 µM Verapamil zu keinem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Erst wenn Verapamil aus der 40-mM-kaliumhaltigen Lösung entfernt wurde, kam es zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration in den Zellen. Dies zeigte deutlich, dass durch 50 µM Verapamil alle spannungsabhängigen Kalzium-

kanäle der Inselzellen, auch solche, die nicht vom L-Typ sind, inhibiert wurden. Das Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumsignal intakter pankreatischer Inseln wurde durch 50  $\mu$ M Verapamil nicht vollständig unterdrückt (Abbildung 4-7b). Im gleichen Experiment reagierten die Inseln jedoch nicht mehr auf die Erhöhung der Glukosekonzentration. Beide Experimente machten deutlich, dass die durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumsignale pankreatischer Inseln und Inselzellen zum Teil auf Kalziumionen, die durch TRPM3-Kanäle in die Zelle strömen, zurückzuführen war.

Bisher mussten wir stets die Aktivität der spannungsabhängigen Kalziumkanäle pankreatischer Inseln pharmakologisch unterdrücken, wobei die verwendeten hohen Dosen von Verapamil auch andere Kanäle beeinflussen können [123, 124]. Um diese unerwünschten Wirkungen von Verapamil zu vermeiden, führten wir Experimente mit genetisch veränderten Mäusen, denen  $\beta$ -Zell-spezifisch der spannungsabhängige Kalziumkanal des Typs  $Ca_v1.2$  fehlt (L2/L2), durch [118]. Diese Mäuse zeigen eine veränderte Insulinsekretion und entwickeln Diabetes [118]. Pankreatische Inseln dieser Mäuse reagierten auf 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der Kalziumkonzentration, der vergleichbar zu dem von Inseln von Kontrollmäusen (WT/L2) war. Die Pregnenolonsulfat-induzierte Kalziumantwort von pankreatischen Inseln war daher unabhängig von der Expression des spannungsabhängigen Kalziumkanals  $Ca_v1.2$ .

#### **4.3.5 Inselzellen von TRPM3-defizienten Mäusen reagieren nicht auf Pregnenolonsulfat oder Nifedipin**

Wir konnten bisher zeigen, dass pankreatische Inselzellen Kalziumkanäle exprimieren, die durch Nifedipin und Pregnenolonsulfat aktiviert werden können. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten zudem, dass Pregnenolonsulfat und Nifedipin Ströme aktivieren, die in ihrer auswärtsrektifizierenden Strom-Spannungs-Charakteristik heterolog exprimierten TRPM3-Kanälen sehr ähnlich sind und ebenfalls durch extrazelluläres Natrium inhibiert werden [61]. Ebenso wurde auch gezeigt, dass pankreatische Inselzellen und Inseln TRPM3 exprimieren [61]. Kürzlich wurden genetisch veränderte Mäuse verfügbar, die keine funktionellen TRPM3-Kanäle exprimieren [76]. Die von uns identifizierten



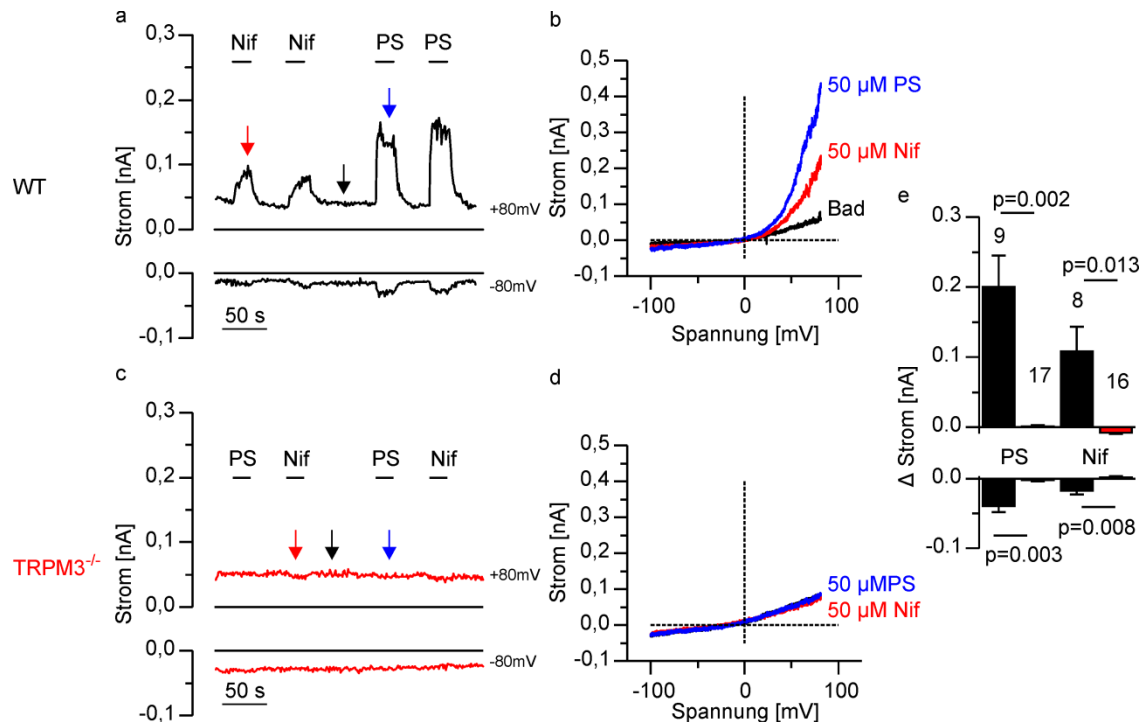
**Abbildung 4-8 Inselzellen von  $TRPM3^{-/-}$  Mäusen zeigen keine Pregnenolonsulfat- oder Nifedipin-induzierten Kalziumsignale.**

(a, b) Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration von pankreatischen Inselzellen mit Fura-2. (a) Die Schwarze Spur zeigt Experimente mit 124 Zellen einer Wildtyp Maus, die rote Spur Experimente mit 416 Zellen aus zwei  $TRPM3^{-/-}$  Tieren. Nur die 124 Zellen der Wildtyp Inseln reagierten auf 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der Kalziumkonzentration, während alle Zellen auf die Depolarisation mit einer 40-mM-kaliumhaltigen Lösung mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antworteten. (b) Pregnenolonsulfat und Nifedipin wurden wie angegeben appliziert. 25 Inselzellen eines  $TRPM3^{-/-}$  Tieres reagierten im Gegensatz zu 27 Zellen eines Kontrolltieres weder auf die Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat noch auf 50  $\mu$ M Nifedipin mit einem Anstieg der Kalziumkonzentration.

---

Signale pankreatischer  $\beta$ -Zellen und Inseln sollten, wenn sie tatsächlich durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen zustande kamen, bei diesen Tieren nicht mehr vorhanden sein. Um dies zu überprüfen, wurden Inselzellen von  $TRPM3$ -defizienten Mäusen und Kontrolltieren präpariert und diese fluorometrisch und elektrophysiologisch untersucht. Inselzellen von  $TRPM3$ -defizienten Tieren reagierten auf die Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit keinerlei Erhöhung des Fura-2-Signals (Abbildung 4-8a, rote Spur), während Inselzellen von Wildtyp Mäusen (Abbildung 4-8a, schwarze Spur) in gewohnter Art und Weise reagierten. Die Kalziumantwort nach Applikation einer 40-mM-kaliumhaltigen Lösung war im gleichen Experiment bei Inselzellen von  $TRPM3$ -defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp Inselzellen weitgehend unverändert. Dies zeigte, dass die Inselzellen von  $TRPM3$ -defizienten Tieren intakt waren. Inselzellen von  $TRPM3$ -defizienten Mäusen (Abbildung 4-8b, rote Spur) reagierten im Gegensatz zu Inselzellen von Wildtyp Mäusen (Abbildung 4-8b, schwarze Spur), auch nicht mehr auf Nifedipin. Pankreatische Inselzellen von  $TRPM3^{-/-}$  Tieren

---



**Abbildung 4-9 Inselzellen von TRPM3-defizienten Mäusen zeigen keine Pregnenolonsulfat- und Nifedipin-induzierten Ströme.**

(a) Patch-Clamp Experiment in der Ganzzellkonfiguration einer pankreatischen Inselzelle einer Wildtyp Maus. Während der Applikation von Spannungsrampen von - 100 mV bis + 100 mV bei einem Haltepotential von 0 mV wurde die Stromentwicklung bei + 80 mV und – 80 mV über die Zeit verfolgt. 50  $\mu$ M Nifedipin (Nif) oder 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat (PS) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten appliziert. (b) Strom-Spannungs-Charakteristik der in a dargestellten Zelle zu den ebenfalls in a mit farbigen Pfeilen angegebenen Zeitpunkten. (c) Wie in a, es wurde aber eine pankreatische Inselzelle einer TRPM3<sup>-/-</sup> Maus untersucht. 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 50  $\mu$ M Nifedipin wurden wie angegeben appliziert. (d) Strom-Spannungs-Beziehung der in c dargestellten Zelle zu den ebenfalls in c mit farbigen Pfeilen angegebenen Zeitpunkten. (e) Mittelwert aller Experimente mit pankreatischen Zellen von Wildtyp Mäusen (schwarz) und TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Die 9 gemessenen Wildtyp Zellen reagierten auf Pregnenolonsulfat mit einer signifikant größeren Zunahme des Stroms bei - 80 mV und bei + 80 mV als die 17 Zellen von TRPM3<sup>-/-</sup> Tieren. Die 8 gemessenen Wildtyp Zellen reagierten auch auf Nifedipin mit einer signifikant größeren Zunahme des Stroms bei - 80 mV und bei + 80 mV als die 16 Zellen von TRPM3<sup>-/-</sup> Tieren. Die verwendeten Zellen stammen aus Präparationen von drei Wildtyp und drei TRPM3<sup>-/-</sup> Tieren.

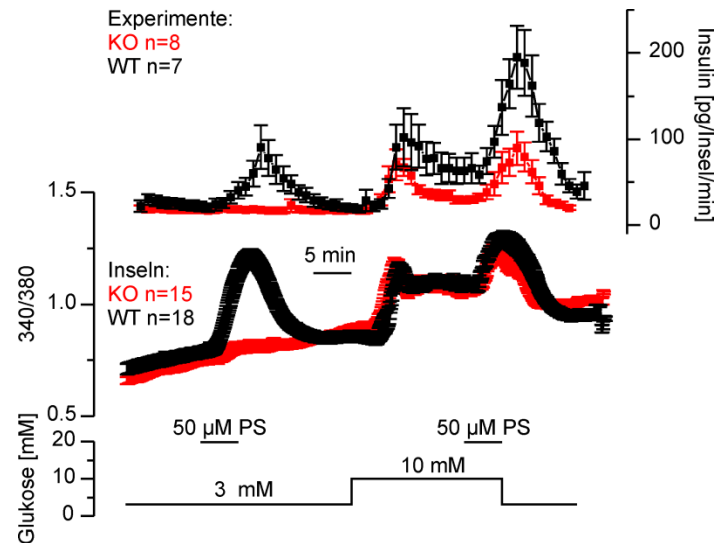
reagierten also nicht mehr auf die Applikation von TRPM3-Agonisten mit einem Anstieg des Fura-2-Signals. Mit Voltage-Clamp Experimenten in der Ganz-

zellkonfiguration wurden pankreatische Inselzellen von Wildtyp und TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen noch weitergehend untersucht. Hierzu wurden ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV Rampen von - 100 mV bis + 100 mV appliziert. Die Applikation von Pregnenolonsulfat und auch von Nifedipin führte bei WT Inselzellen zu einer schnellen Zunahme des Einwärts- sowie des Auswärtsstroms (Abbildung 4-9a, b, e). Die Pregnenolonsulfat- und Nifedipin-induzierten Ströme wiesen dabei die gleiche auswärtsrektifizierende Strom-Spannungs-Charakteristik wie heterolog exprimierte TRPM3-Kanäle auf (Abbildung 4-8b) [26, 61]. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Pregnenolonsulfat und auch von Nifedipin bei Inselzellen von TRPM3<sup>-/-</sup> Tieren weder beim Einwärts- noch beim Auswärtsstrom zu einer Erhöhung des Basisstroms (Abbildung 4-9c, d).

Die statistische Auswertung der Experimente mit TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 4-9c) zeigten deutlich, dass TRPM3-Kanalproteine essentiell für die Pregnenolonsulfat und Nifedipin-induzierten Ströme und Kalziumsignale von pankreatischen Inselzellen sind.

#### **4.3.6 Der Einstrom von Kalzium durch TRPM3-Kanäle führt schon bei niedrigen Glukosekonzentrationen zu einer verstärkten Insulinfreisetzung.**

Wir untersuchten, ob die zuvor beschriebene (Kapitel 4.3.3) durch Pregnenolonsulfat hervorgerufene Insulinsekretion von pankreatischen Inseln von Wildtyp Mäusen unterschiedlich zur Insulinsekretion von Inseln von TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen war. Hierfür wurden in einer Doppelblindstudie Kalziummessungen mit pankreatischen Inseln von Wildtyp und TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt und parallel der zeitliche Verlauf der Insulinsekretion aufgezeichnet. Die Inseln der Wildtypgruppe reagierten bei einer Glukosekonzentration der Perfusionslösung von 3 mM auf die Zugabe von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat mit einer schnellen und starken Zunahme der Kalziumkonzentration (Abbildung 4-10, schwarze Spur), was zu einer bis um das dreifache erhöhten Insulinsekretion (Abbildung 4-10, schwarze Punkte) führte. Wurde Pregnenolonsulfat aus der Perfusionslösung entfernt, so sank die Kalziumkonzentration wieder und die Insulinsekretion ging



**Abbildung 4-10 TRPM3-Kanäle sind in 3 mM Glukose essentiell für die Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignale und die dadurch verstärkte Insulinsekretion von pankreatischen Inseln.**

Die schwarzen Datenpunkte zeigen die mittlere Insulinsekretion von 7 individuellen Experimenten mit je 13 - 100 Inseln (insgesamt 266) von Wildtyp Mäusen. Die untere schwarze Linie zeigt den mittleren Verlauf der Fura-2-Signale von 18 Inseln dieser 7 Experimente. Die in rot aufgetragenen Datenpunkte zeigen die mittlere Insulinsekretion von 8 individuellen Experimenten mit je 12 - 41 Inseln (insgesamt 226) von TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen. Die untere rote Linie zeigt das während dieser Experimente aufgezeichnete mittlere Fura-2-Signal von 15 einzelnen Inseln. Fehlerbalken zeigen stets den Standardfehler des Mittelwertes. Lösungen mit unterschiedlicher Glukosekonzentration von 3 mM und 10 mM sowie 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat (PS) wurden wie angegeben appliziert.

---

auf Basisniveau zurück. Pankreatische Inseln von TRPM3<sup>-/-</sup> Mäusen reagierten dagegen in 3 mM Glukose auf die Zugabe von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat weder mit einer Zunahme des Fura-2-Signals (Abbildung 4-10, rote Spur) noch mit einer erhöhten Insulinsekretion (Abbildung 4-10, rote Punkte). Die Expression von funktionellen TRPM3-Kanälen war daher essentiell für die durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumsignale und die damit verbundene verstärkte Insulinsekretion von pankreatischen Inseln in 3 mM Glukose.

Die Erhöhung der Glukosekonzentration von 3 mM auf 10 mM induzierte bei TRPM3<sup>-/-</sup> Inseln sowie bei Wildtyp Inseln Kalziumsignale. Diese waren zwischen Wildtyp und TRPM3<sup>-/-</sup> Inseln nicht signifikant unterschiedlich. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten stieg die Insulinsekretion schnell mit dem

---

Anstieg der Kalziumkonzentration an und fiel dann bis zum Erreichen eines stabilen Niveaus ab. Zwischen den beiden Gruppen konnte dabei kein signifikanter Unterschied im Verlauf und der Menge der Glukose induzierten Insulinsekretion festgestellt werden. Dies zeigte deutlich, dass die durch 10 mM Glukose ausgelöste Insulinfreisetzung unabhängig von der Expression von TRPM3-Kanälen war. Nachdem die Glukose-induzierte Insulinsekretion ein stabiles Niveau erreicht hatte, wurde der Perfusionslösung wiederum 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat zugesetzt. Dies führte bei Experimenten mit Inseln von Wildtyp Mäusen zu einem raschen Anstieg der Kalziumkonzentration und dadurch zu einem Anstieg der Insulinsekretion. Völlig unerwartet bewirkte die Applikation von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat in 10 mM Glukose auch bei Experimenten mit Inseln von TRPM3<sup>-/-</sup> Tieren einen Anstieg der Kalziumkonzentration. Dies führte ebenfalls zu einer verstärkten Sekretion von Insulin, die jedoch geringer war als bei Experimenten mit Inseln von Wildtyp Tieren. Die durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Erhöhung der Insulinsekretion war in 10 mM Glukose daher nur zum Teil auf die Aktivierung von TRPM3-Kanälen zurückzuführen.



## **4.4 Diskussion**

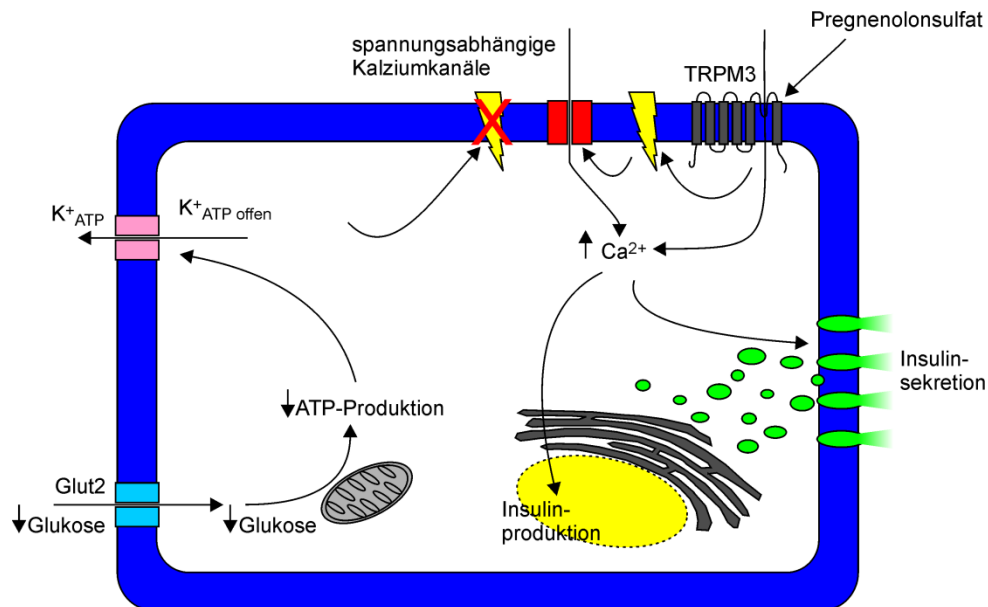
Die  $\beta$ -Zellen des Pankreas sind für den Energiestoffwechsel von Säugetieren von elementarer Bedeutung. Sie produzieren und sekretieren Insulin, welches an Insulinrezeptoren von Leber-, Muskel- und Fettzellen bindet und in diesen Zellen vielfältige Prozesse, wie die Glukoseaufnahme, den Lipid- und Protein-stoffwechsel sowie die Regulation der Genexpression der dazu notwendigen Proteine, auslöst. Darüberhinaus hemmt es die Lipolyse und fördert zudem die Aufnahme von Fettsäuren [71, 90, 91].

Wir zeigen hier erstmalig, dass pankreatische  $\beta$ -Zellen auf die Applikation von Pregnenolonsulfat mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagieren, während die Glukagon-sekretierenden  $\alpha$ -Zellen pankreatischer Inseln nicht durch Pregnenolonsulfat beeinflusst werden. Diese Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wird durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen in der Plasmamembran der  $\beta$ -Zellen ausgelöst. Die durch Pregnenolonsulfat ausgelösten Kalziumsignale pankreatischer  $\beta$ -Zellen und TRPM3-exprimierender HEK293 Zellen unterschieden sich in ihrem zeitlichen Verlauf voneinander. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur TRPM3 sondern auch andere Kanäle zum Kalziumsignal der  $\beta$ -Zellen beitragen, die nicht von HEK293 Zellen exprimiert werden. Es ist denkbar, dass der Einstrom von Kationen durch aktivierte TRPM3-Kanäle die Zellmembran depolarisiert. Der Kalziumeinstrom durch TRPM3-Kanäle könnte TRPM4- und TRPM5-Kanäle der  $\beta$ -Zellen aktivieren [108, 110], wodurch die Zellmembran noch stärker depolarisiert werden würde. Unter diesen Bedingungen ist davon auszugehen, dass spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert werden, die dann zum anfänglich hohen Kalziumsignal der  $\beta$ -Zellen beitragen könnten. Der anschließende Abfall des Signals könnte durch die Inaktivierung der spannungsabhängigen Kanäle bedingt sein, da die dauerhafte Depolarisation der Zellen, ebenso wie das Ansteigen der intrazellulären Kalziumkonzentration selbst, zur Inaktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt [125]. Dadurch würden diese Kanäle nicht mehr zum Kalziumsignal beitragen und das Fura-2-Signal der Zellen würde wie beobachtet abnehmen. Da HEK293 Zellen keine spannungsabhängigen Kalziumkanäle exprimieren, wäre es eine Erklärung dafür, warum wir in den

Experimenten mit TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen keine große Abnahme des Fura-2-Signals beobachten konnten. Auch die Inaktivierung von TRPM3-Kanälen könnte zur stetigen Abnahme des Kalziumsignals bei längerer Stimulation mit Pregnenolonsulfat beitragen. So ist es denkbar, dass einströmendes Magnesium TRPM3-Kanäle inhibiert [21].

Wir zeigen, dass Pregnenolonsulfat nicht nur über einen schnellen Mechanismus die Kalziumkonzentration der  $\beta$ -Zellen erhöht, sondern auch die Insulinfreisetzung dieser Zellen verstärkt. Die Aktivierung dieser Kanäle ist also ein bisher unbekannter Weg zur Insulinfreisetzung aus pankreatischen Inseln. Neben TRPM3 werden aber auch diverse Vertreter der TRP-Kanalproteine von  $\beta$ -Zellen exprimiert [106, 126], die teilweise auch zur Insulinsekretion beitragen können. TRPM3 ist aber der erste TRP-Kanal pankreatischer  $\beta$ -Zellen, für den gezeigt wurde, dass seine Aktivierung durch einen endogen gebildeten Liganden die Insulinfreisetzung verstärkt. Da es sich bei Pregnenolonsulfat um ein Steroid handelt, bilden TRPM3-Kanäle eine direkte Verbindung zwischen dem Steroidhormonsystem und dem Energiestoffwechsel.

Abbildung 4-11 zeigt ein auf unseren Ergebnissen beruhendes Modell einer  $\beta$ -Zelle in 3 mM Glukose. Durch die Aktivierung von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat können Kalziumionen in die Zelle einströmen und direkt die Insulinsekretion verstärken. Der Einstrom von Kationen kann gleichzeitig über verschiedene Mechanismen die Zelle depolarisieren und spannungsabhängige Kalziumkanäle aktivieren, durch die weitere Kalziumionen einströmen, die dann ebenfalls zur Insulinsekretion beitragen. Unter 10 mM Glukose Bedingungen ist die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle bereits in Gang gesetzt. Hier führt die Zugabe von Pregnenolonsulfat über die Aktivierung von TRPM3-Kanälen und über einen von der Expression von TRPM3 unabhängigen Weg zur weiteren Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, was auch die Insulinsekretion verstärkt (Abbildung 4-12). Während also TRPM3-Kanäle bei niedrigen Glukosekonzentrationen essentiell sind für die Pregnenolonsulfat-induzierten Kalziumsignale und die Insulinfreisetzung, so gibt es bei hoher Glukosekonzentration, auch von der Expression von TRPM3 unabhängig auftretende Pregnenolonsulfateffekte. Da Pregnenolonsulfat auch diverse andere Rezeptoren



**Abbildung 4-11 Modell der Wirkung von Pregnenolonsulfat auf pankreatischen  $\beta$ -Zellen in 3 mM Glukose.**

In 3 mM Glukose befindet sich die  $\beta$ -Zelle in Ruhe. Die ATP-Produktion ist gering und daher sind die  $K_{ATP}$ -Kanäle offen. Daraus resultiert ein niedriges Membranpotential weshalb auch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle geschlossen sind und keine Kalziumionen in die Zelle strömen. TRPM3-Kanäle der  $\beta$ -Zelle können aber unter diesen Bedingungen durch Pregnenolonsulfat aktiviert werden, wodurch Kalziumionen in die Zelle einströmen können und die Insulinsekretion verstärken. Eine durch diesen Kationeneinstrom bedingte Depolarisation der Zellmembran könnte zusätzlich spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen und das Kalziumsignal dadurch verstärken.

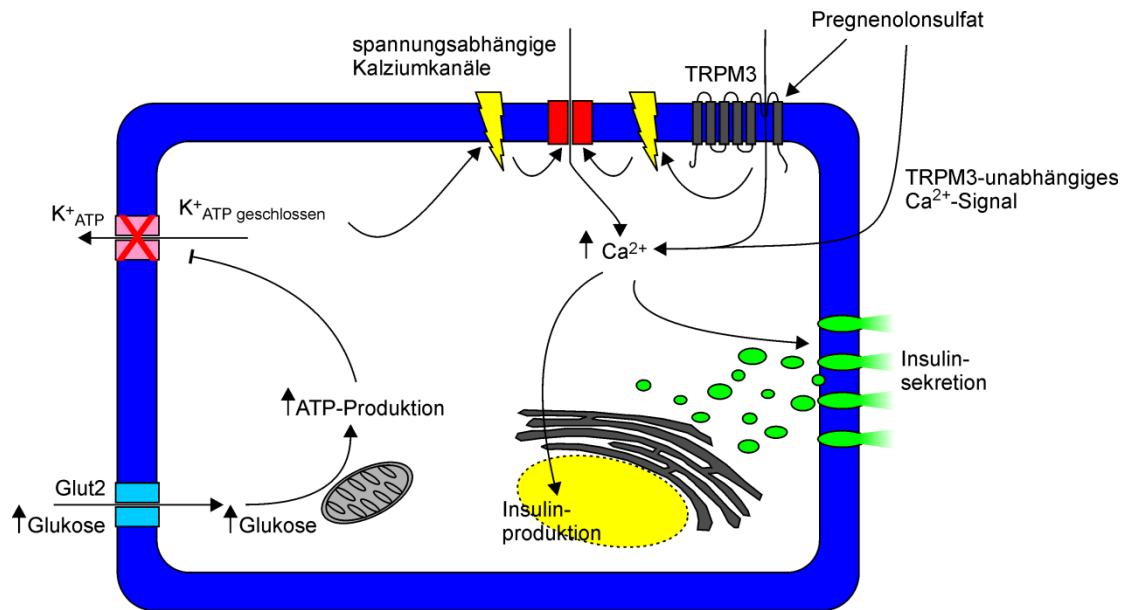
---

beeinflusst [32-36], ist die Liste der Kandidaten, die diese von der Expression von TRPM3 unabhängigen Effekte vermitteln, lang. Es wird daher interessant sein, auf molekularer Ebene zu untersuchen, wie diese Kalziumsignale zustande kommen. Vorstellbar wäre, dass Pregnenolonsulfat, wie bereits beschrieben [37], die Aktivität spannungsabhängiger Kalziumkanäle der  $\beta$ -Zelle moduliert ohne diese direkt zu aktivieren. Dies würde auch das Fehlen der unspezifischen Effekte bei niedrigen Glukosekonzentrationen erklären. Unter diesen Bedingungen sind die spannungsabhängigen Kalziumkanäle inaktiv und Pregnenolonsulfat wirkungslos. Bei hohen Glukosekonzentrationen sind die spannungsabhängigen Kalziumkanäle dagegen aktiviert und der Kalzium-einstrom durch diese Kanäle würde durch Pregnenolonsulfat verstärkt werden.

---

Ob Pregnenolonsulfat in vivo TRPM3-Kanäle pankreatischer  $\beta$ -Zellen beeinflusst und ob diese Kanäle bei der physiologischen Insulinsekretion eine Rolle spielen, bleibt trotz der hier gezeigten Ergebnisse spekulativ. Die Konzentrationen von Pregnenolonsulfat, die für eine Aktivierung von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen nötig sind, liegen mit 5  $\mu\text{M}$  an der Obergrenze der bisher im menschlichen Plasma nachgewiesenen Pregnenolonsulfatkonzentrationen von 0.2 - 5  $\mu\text{M}$ . Die pharmakologische Dosis von 50  $\mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat, die zur Insulinfreisetzung von pankreatischen Inseln benötigt wird, ist jedoch wiederum zehnmal höher und es scheint daher eher unwahrscheinlich, dass die Aktivierung von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat physiologisch eine Rolle bei der Insulinsekretion spielt. Es ist aber dennoch nicht auszuschließen, dass Pregnenolonsulfat zu bestimmten Zeiten oder räumlich begrenzt in Konzentrationen im Körper vorliegt, die TRPM3-Kanäle aktivieren können [28]. Nichts desto trotz könnte die Regulation von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat eine andere wichtige Rolle in pankreatischen  $\beta$ -Zellen spielen. Die höchste Pregnenolonsulfatkonzentration wurde im Blut der Nabelschnurarterie von Föten und im Plasma von Müttern, die gerade entbunden haben, nachgewiesen, also unter sehr speziellen Bedingungen [80, 83-86]. Da die Pregnenolonsulfatkonzentration im Plasma während der Schwangerschaft erhöht ist, wäre es interessant zu untersuchen, ob TRPM3-Kanäle eine Rolle bei der Vergrößerung der Masse der  $\beta$ -Zellen während der Schwangerschaft [127] spielen. TRPM3-Kanäle leiten außerdem sehr gut Zink [26] und könnten somit zur Zinkhomöostase von  $\beta$ -Zellen beitragen, welche speziell für diese Zellen von großer Bedeutung ist [128, 129]. In Kapitel 5 wird dieser Aspekt noch ausgiebig behandelt.

Neben den genannten physiologischen Gründen für eine erhöhte Pregnenolonsulfatkonzentration im Plasma gibt es auch pathophysiologische Gründe für das Ansteigen des Pregnenolonsulfatspiegels. So wurde bei Patienten mit einer 21-Hydroxylasedefizienz [130], bei Patienten bei denen eine gemischte Angst-Depressive Störung diagnostiziert wurde [131] und bei Hyperthyroidismus [132] ein erhöhter Pregnenolonsulfatspiegel im Plasma festgestellt. Unter diesen Umständen ist zu erwarten, dass TRPM3-Kanäle aktiviert werden, wobei in diesem Zusammenhang erwähnt werden muss, dass bei Patienten mit



**Abbildung 4-12 Modell der Wirkung von Pregnenolonsulfat auf pankreatischen  $\beta$ -Zellen in 10 mM Glukose**

In 10 mM Glukose ist die  $\beta$ -Zelle bereits aktiviert und die Kalziumkonzentration der Zelle erhöht. Dies ist bedingt durch die Verstoffwechselung der Glukose, was über die vermehrte ATP-Produktion zur Schließung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle führt. Die resultierende Depolarisation der Zellmembran führt zur Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, wodurch Kalziumionen in die Zelle strömen und zur Insulinsekretion führen. Werden TRPM3-Kanäle der  $\beta$ -Zelle unter diesen Bedingungen durch Pregnenolonsulfat aktiviert, verstärken die einströmenden Kalziumionen die Insulinsekretion. Eine durch diesen Kationeneinstrom bedingte weitere Depolarisation der Zellmembran könnte zur Öffnung weiterer spannungsabhängiger Kalziumkanäle führen und das Kalziumsignal dadurch ebenfalls verstärken. Darüberhinaus gibt es unter diesen Bedingungen auch einen von der Expression von TRPM3 unabhängigen Mechanismus über den Pregnenolonsulfat die Kalziumkonzentration der Zellen erhöht.

21-Hydroxylasedefizienz auch eine erhöhte Insulinkonzentration im Plasma und eine veränderte Insulinsensitivität festgestellt wurde [133, 134]. Die Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch Pregnenolonsulfat könnte daher unter diesen Umständen von klinischer Relevanz sein.

Letztendlich könnten TRPM3-Kanäle die Funktion von pankreatischen  $\beta$ -Zellen auch unabhängig von Pregnenolonsulfat beeinflussen. So besteht die Möglichkeit, dass eine andere endogen gebildete, bisher nichtidentifizierte Substanz TRPM3-Kanäle stärker aktiviert als Pregnenolonsulfat.

Da die Aktivierung von TRPM3-Kanälen bei Langerhans-Inseln zu einer verstärkten Insulinsekretion führt, sind TRPM3-Kanäle aus pharmakologischer Sicht ein möglicher bisher unbekannter Angriffspunkt für neue Antidiabetika. Ob Pregnenolonsulfat hierfür eingesetzt werden kann ist jedoch fraglich. Denn obwohl für Pregnenolonsulfat diverse Wirkungen beschrieben wurden [27, 135, 136], findet sich in all diesen Berichten kein Hinweis darauf, dass die Verabreichung von Pregnenolonsulfat zu einer verstärkten Insulinsekretion führt. Dies könnte auf den enzymatischen Abbau [50], die Bindung an Plasmaproteine oder die Anreicherung in zelluläre Membranen [58] zurückzuführen sein, wodurch die Konzentration von freiem Pregnenolonsulfat deutlich erniedrigt würde. Die Suche nach einem potenten, eventuell oral verfügbaren und spezifischen Agonisten von TRPM3 ist daher eine reizvolle Aufgabe, da er eventuell als orales Antidiabetikum eingesetzt werden könnte.

## 5 Pregnenolonsulfat verstärkt die Zinkaufnahme von pankreatischen Inselzellen

### Zusammenfassung

Zink spielt eine entscheidende Rolle bei der Synthese und Speicherung von Insulin pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Da diese Zellen während der Sekretion von Insulin permanent auch Zink abgeben [137, 138], muss dieses permanent wieder aufgenommen werden. Bekannt ist bisher, dass Zink durch spannungsabhängige Kalziumkanäle in  $\beta$ -Zellen gelangt [25]. Pankreatische  $\beta$ -Zellen exprimieren aber auch TRPM3-Kanäle, die durch Pregnenolonsulfat aktiviert werden können [61]. Heterolog überexprimierte TRPM3-Kanäle leiten zudem Zinkionen [26]. Wir untersuchten daher, ob TRPM3-Kanäle zur Zinkaufnahme von pankreatischen  $\beta$ -Zellen beitragen können. Mit Hilfe des zinkselektiven fluoreszenten Farbstoffs FluoZin-3 [139, 140] konnten wir zeigen, dass Pregnenolonsulfat bei pankreatischen Inselzellen einen Einstrom von Zink auslöst. Im Gegensatz zum Zinkeinstrom durch spannungsabhängige Kanäle, der durch Depolarisation ausgelöst wird, wurde der durch Pregnenolonsulfat induzierte Zinkeinstrom nur moderat durch 10  $\mu$ M Verapamil blockiert. Er war daher zumindest zum Teil auf die Aktivierung von Kanälen zurückzuführen, die von spannungsabhängigen Kalziumkanälen verschieden sind. Zusammen mit den Ergebnissen der vorigen Kapitel zeigen diese Daten, dass TRPM3-Kanäle eine regulierte Zinkaufnahme von pankreatischen  $\beta$ -Zellen vermitteln können. TRPM3-Kanäle könnten eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Zinkhomöostase von pankreatischen  $\beta$ -Zellen spielen.

## **5.1 Einleitung**

Zink ist ein wichtiges Spurenelement lebender Organismen und spielt eine Schlüsselrolle bei vielen biologischen Prozessen [141]. Normalerweise ist die Konzentration von freiem Zink im Körper sehr gering. Die totale Zinkkonzentration dagegen kann in einer Körperzelle 150 - 200  $\mu\text{M}$  erreichen, wobei die zytosmatische Zinkkonzentration durch Zinkpuffer [142] und durch die Einlagerung von Zink in Vesikel niedrig gehalten wird. Die Zinkhomöostase wird zudem durch Zinktransporter in der Plasmamembran und in den Membranen intrazellulärer Kompartimente reguliert. Zinktransporter der ZnT-Familie pumpen Zink aus dem Zytoplasma über die Zellmembran aus der Zelle oder reichern es in intrazellulären Kompartimenten an, während die Zip-Familie von Zinktransporten entgegengesetzt arbeiten [143-145]. Besonders für die Funktion pankreatischer  $\beta$ -Zellen spielen Zinkionen eine entscheidende Rolle. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, liegt die Hauptaufgabe von pankreatischen  $\beta$ -Zellen in der Regulation der Blutglukosekonzentration durch die gesteuerte Abgabe von Insulin. Um diese Aufgabe zu erfüllen, stellt jede  $\beta$ -Zelle viele mit Insulin gefüllte Vesikel bereit. Für die Biosynthese des Insulins und die Verpackung in Vesikel sind Zinkionen ein essentieller Faktor. Insulin wird aus dem Vorläuferprotein Präproinsulin über ein Zwischenprodukt, das Proinsulin, in der  $\beta$ -Zelle gebildet [128]. Nach der Abspaltung einer Signalsequenz des Präproinsulins wird das dadurch entstandene Proinsulin in den Golgi-Apparat transportiert. Dort wird es in zink- und kalziumhaltige Vesikel abgesondert, und bildet mit Zink- und Kalziumionen hexamere Komplexe. Ein solcher Komplex setzt sich immer aus zwei Zinkionen, einem Kalziumion und sechs Proinsulinproteinen zusammen:  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{ProIns})_6$ . In den sekretorischen Vesikeln entstehen durch die Entfernung eines C-Peptid genannten Teils des Proinsulins durch Trypsin- und Carboxypeptidase-ähnliche Enzyme aus den hexameren Proinsulinkomplexen, hexamere Insulinkomplexe  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Ins})_6$ . Dabei führt die Komplexbildung des Proinsulins mit Zink und Kalzium dazu, dass nur das C-Peptid durch die Enzyme abgespalten wird und andere Teile des Proinsulins nicht gespalten werden können. Das Entfernen des C-Peptids ändert die Löslichkeit des Insulinkomplexes, wodurch sich  $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Ins})_6$ -Kristalle



in den Vesikeln bilden und das neu gebildete Insulin weiter stabilisiert wird [128]. In dieser kristallinen Form ist das Insulin nicht wirksam und entfaltet seine Wirkung erst nach der Sekretion und dem Zerfall der Hexamere zu monomerem Insulin, Kalzium und Zink [128, 146]. Dies geschieht, wenn das Insulin ins Blutplasma abgegeben wird, wo sich die Insulinkristalle aufgrund des höheren pH-Wertes auflösen. Die Zinkkonzentration der Insulinvesikel kann bis zu 20 mM betragen [129, 147]. Somit ist jede Ausschüttung von Insulin mit einer erheblichen Freisetzung von Zink verbunden [137, 138]. Während das abgegebene Insulin von der Zelle selbst wieder neu gebildet wird, muss jede  $\beta$ -Zelle das mit dem Insulin sekretierte Zink wieder über die Plasmamembran aufnehmen. Auf molekularer Ebene ist bisher nicht vollkommen geklärt, welche Mechanismen und Proteine an diesem Prozess beteiligt sind. Zwar wurden bereits diverse Zinktransporter in  $\beta$ -Zellen nachgewiesen, funktionell konnte aber nur die Beteiligung spannungsabhängiger Kalziumkanäle an der Zinkaufnahme gezeigt werden [25]. Da die Aktivität der spannungsabhängigen Kalziumkanäle an den metabolischen Status der  $\beta$ -Zelle geknüpft ist, ist nicht zu erwarten, dass spannungsabhängige Kanäle zu Zeiten eines niedrigen Blutzuckerspiegels, in denen die Zellen nicht depolarisiert sind, zur Zinkaufnahme beitragen [25]. Somit ist nicht geklärt, wie pankreatische  $\beta$ -Zellen unter Ruhebedingungen Zink aufnehmen. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch TRPM3-Kanäle Zinkionen gut leiten [26]. TRPM3-Kanäle könnten daher die Zinkaufnahme pankreatischer  $\beta$ -Zellen regulieren.

## **5.2 Material und Methoden**

### **5.2.1 Zellkultur**

Pankreatische Zellen wurden wie zuvor beschrieben präpariert und kultiviert (Kapitel 4.2.2).

### **5.2.2 Messung der intrazellulären Zinkkonzentration mit FluoZin-3**

Zur Messung der intrazellulären Zinkkonzentration von pankreatischen Inselzellen wurde FluoZin-3 (Invitrogen) verwendet. Dieser fluoreszente Farbstoff besitzt sein Anregungsmaximum bei 488 nm. Die Emission wird bei 525 nm detektiert und nimmt mit steigender Zinkkonzentration zu. FluoZin-3 bindet Zinkionen mit hoher Affinität ( $K_d \sim 15$  nm) und wird durch Kalziumkonzentrationen bis zu 1  $\mu$ M nicht beeinträchtigt [140]. Auch FluoZin-3 gelangt wie Fura-2 als Acetoxymethylestherverbindung in die Zelle. In allen Experimenten wurden die Zellen 30 min mit 5  $\mu$ M FluoZin-3-AM bei Raumtemperatur geladen. Bilder bei 488 nm Anregungswellenlänge wurden alle 2,5 s mit einem 10x SFluor Objektiv (Nikon) und einer gekühlten CCD-Kamera (QImaging) aufgenommen. Für jedes Bild wurde ein Hintergrundwert ermittelt und subtrahiert. Hierzu wurde ein Bereich, der keine Zellen enthielt, mit Hilfe des Programms ImageJ als ROI markiert (siehe Kapitel 2.2) und die mittlere Fluoreszenzintensität dieses Bereiches von jedem Pixel des Bildes subtrahiert. Die Zellen wurden ebenfalls durch eine ROI markiert. Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen wurden auf den Anfangswert normalisiert. Hierzu wurden alle, für eine bestimmte ROI ermittelten Fluoreszenzwerte, durch den Fluoreszenzwert des ersten Bildes dieser ROI geteilt. Alle Experimente wurden in einer geschlossenen Perfusionskammer durchgeführt (siehe Kapitel 2.2). Dabei enthielt die Standardlösung in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Der pH wurde mit 2 M NaOH auf 7,4 eingestellt. N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-Ethylenediamine (TPEN) wurde in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst. 20  $\mu$ M TPEN-haltige Badlösung wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge dieser Stocklösung zur Badlösung hergestellt. Die 40-mM-kaliumhaltige Lösung enthielt in mM: 105 NaCl,

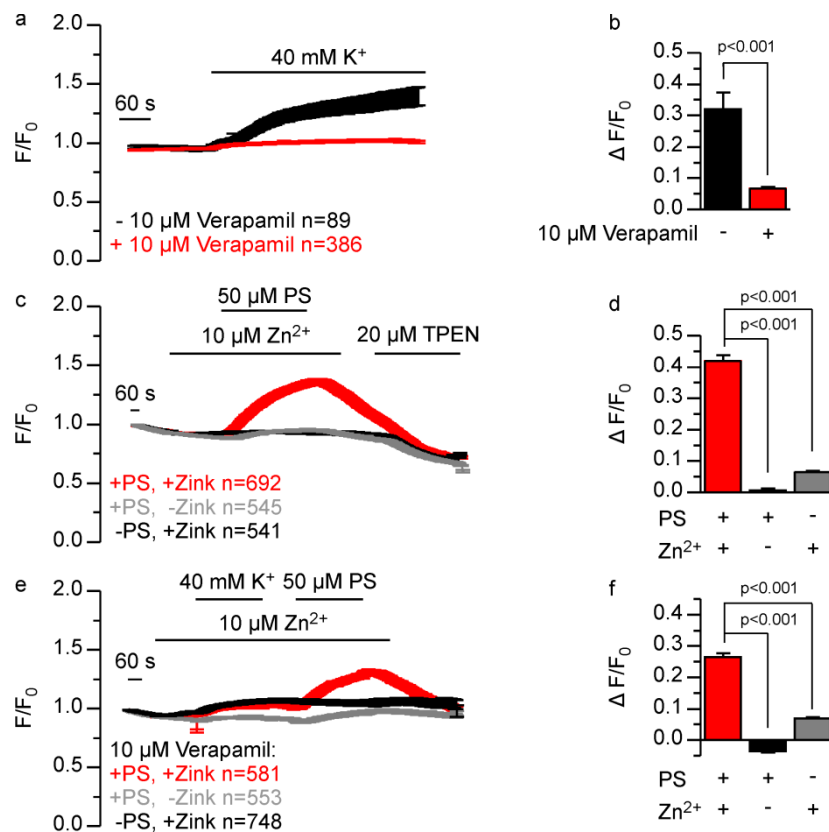
40 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Der pH-Wert wurde auch hier mit 2 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die 10- $\mu$ M-zinkhaltigen Lösungen wurden aus diesen Badlösungen durch Zugabe von 100 mM Zinkstocklösung (5  $\mu$ l Zinkstocklösung / 50 ml Standardlösung) hergestellt. Verapamil wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. 10  $\mu$ M Verapamil-haltige Lösungen wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge dieser Stocklösung zur jeweiligen Lösung hergestellt. Die Perfusionsrate betrug bei allen Experimenten  $\sim$  1 ml / min.

### **5.2.3 Statistische Auswertung der Experimente**

Um die durch die Applikation einer bestimmten Substanz oder Lösung ausgelöste Änderung des Zinksignals statistisch zu vergleichen, wurde die Fluoreszenzintensität einer ROI vor Beginn der Applikation ( $F_1$ ) und vor Beendigung der Applikation ( $F_2$ ) einer Lösung oder Substanz ermittelt. Aus den für jede ROI ermittelten Differenzwerten  $F_2 - F_1$  wurde dann ein Mittelwert gebildet. Mit Hilfe von ungepaarten t-Test Analysen nach Student wurden Unterschiede zwischen Datensätzen ermittelt, wobei ein p-Wert von  $p < 0.05$  als statistisch signifikant gewertet wurde. Fehlerbalken repräsentieren immer den Standardfehler des Mittelwertes.

### **5.3 Ergebnisse**

Wir untersuchten, ob TRPM3-Kanäle als Zinkeintrittsweg in pankreatische  $\beta$ -Zellen dienen können. Hierzu wurden Experimente mit dem zinkselektiven fluorometrischen Farbstoff FluoZin-3 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob wir in unserer Versuchsanordnung Zinksignale pankreatischer Inselzellen messen können, wurde der Einstrom von Zink über spannungsabhängige Kalziumkanäle [25] gemessen. Wie in Abbildung 5-1a, b deutlich zu sehen ist, führte die Depolarisation durch eine 40-mM-kaliumhaltige Lösung bei mit FluoZin-3 geladenen pankreatischen Inselzellen in einer Perfusionslösung, die 10  $\mu$ M Zink enthielt, zu einer schnellen und starken Zunahme der FluoZin-3 Fluoreszenz. Dieser Effekt blieb aus, wenn im gleichen Protokoll die spannungsabhängigen Kalziumkanäle mit 10  $\mu$ M Verapamil und damit der Zinkeintrittsweg blockiert wurden. Folglich wurde die durch Depolarisation ausgelöste Zunahme der Zinkkonzentration der Inselzellen, wie bereits beschrieben [25], von spannungsabhängigen Kalziumkanälen getragen. Dies zeigte, dass es möglich war, Zinksignale pankreatischer Inselzellen mit Hilfe von FluoZin-3 basierten, fluorometrischen Messungen zu detektieren. Nachdem das Messverfahren validiert war, konnte untersucht werden, inwiefern auch Pregnenolonsulfat-aktivierte TRPM3-Kanäle zur Wiederaufnahme von Zink beitragen können. Mit FluoZin-3 geladene pankreatische Inselzellen wurden dafür in zinkfreier Perfusionslösung gehalten und der Verlauf der FluoZin-3 Fluoreszenz aufgezeichnet. Wurde dieser Lösung 10  $\mu$ M Zink zugesetzt, so führte dies zu einer leichten Zunahme der FluoZin-3 Fluoreszenz. Wurde dem Perfusat im gleichen Zeitraum kein Zink zugesetzt, so blieb die leichte Zunahme der FluoZin-3 Fluoreszenz aus (Abbildung 5-1c, d). Dies ließ auf die Anwesenheit eines konstitutiv aktiven zinkdurchlässigen Kanals oder Transporters schließen, auf den der Zinkeinstrom in die pankreatischen Inselzellen zurückzuführen war. Wenn die Zellen mit 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat stimuliert wurden, so stieg die FluoZin-3 Fluoreszenz in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Zink (rote Spur) stark an. Dabei war die Zunahme der FluoZin-3 Fluoreszenz zum Großteil auf einen Zinkeinstrom in die Zelle zurückzuführen, da die FluoZin-3 Fluoreszenz nur leicht zunahm, wenn die Perfusionslösung nur Pregnenolonsulfat und kein Zink enthielt. Diese leichte



**Abbildung 5-1 Messung der intrazellulären Zinkkonzentration von pankreatischen Inselzellen**

(a, c, e) Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität von FluoZin-3 geladenen pankreatischen Inselzellen. (a) 40-mM-kaliumhaltige Lösung wurde wie angegeben ohne (schwarze Spur) und mit (rote Spur) 10  $\mu$ M Verapamil appliziert. (b) Statistische Auswertung der in a gezeigten Experimente. Die Farbkodierung wurde beibehalten. (c) 10  $\mu$ M Zink, 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat (PS) und 20  $\mu$ M TPEN wurden wie angegeben appliziert (rote Spur). Die schwarze Spur zeigt Experimente bei denen kein Pregnenolonsulfat in der Perfusionslösung vorhanden war. Die graue Spur zeigt Experimente in denen die Perfusionslösung kein Zink enthielt. (d) Statistische Auswertung der in c gezeigten Experimente. Die Farbkodierung wurde beibehalten. (e) Die Perfusionslösung enthielt stets 10  $\mu$ M Verapamil. 10  $\mu$ M Zink, 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat und 40-mM-kaliumhaltige Lösung wurden angegeben appliziert (rote Spur). Die schwarze Spur zeigt Experimente bei denen sich kein Pregnenolonsulfat in der Perfusionslösung befand. Die graue Spur repräsentiert Experimente, in denen Zink aus der Perfusionslösung entfernt wurde. (f) Statistische Auswertung der in e gezeigten Experimente. Die Farbkodierung wurde beibehalten. (b, d, f) p-Werte statistisch signifikanter Unterschiede wurden eingezeichnet.

Zunahme in zinkfreier Lösung könnte auf Zinkverunreinigungen oder auf den Einstrom von anderen divalenten Ionen und deren Bindung an FluoZin-3 zu-

rückzuführen sein (Abbildung 5-1c graue Spur). Wurden die Zellen in 10- $\mu$ M-zinkhaltiger Lösung nicht mit Pregnenolonsulfat stimuliert, so kam es zu keiner Zunahme der FluoZin-3 Fluoreszenz (schwarze Spur). Dies zeigte deutlich, dass der Zinkeinstrom in pankreatische Inselzellen durch Pregnenolonsulfat-sensitive Kanäle und demnach höchstwahrscheinlich durch TRPM3 vermittelt wurde. Mit der Entfernung von Pregnenolonsulfat aus der Perfusionslösung fiel trotz Anwesenheit von Zink die FluoZin-3 Fluoreszenz ab. Dies lässt darauf schließen, dass Zink aktiv durch Transporter oder passiv durch Kanäle aus dem Zytosol der Inselzellen entfernt wurde. Dies kann entweder durch die Aufnahme in intrazelluläre Kompartimente oder Abgabe über die Zellmembran vonstatten gehen. Die Steilheit des Abfalls der FluoZin-3 Fluoreszenz veränderte sich auch mit der zusätzlichen Wegnahme von Zink aus der Lösung im weiteren Verlauf des Experiments nur wenig. Die spätere Zugabe des membranpermeablen Zinkchelators TPEN in einer Konzentration von 20  $\mu$ M zur zinkfreien Lösung führte zur Reduktion der FluoZin-3 Fluoreszenz auf den Basiswert.

Durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen und den damit verbundenen Einstrom von Kationen kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Diese Depolarisation könnte wiederum zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führen, die dann ebenfalls zum Zinkeinstrom beitragen könnten. Wir untersuchten deshalb, inwiefern der durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Zinkeinstrom auch durch spannungsabhängige Kalziumkanäle getragen wurde. Hierfür wurde die Reaktion der Inselzellen auf Pregnenolonsulfat untersucht während die spannungsabhängigen Kalziumkanäle mit Hilfe von 10  $\mu$ M Verapamil inhibiert wurden.

FluoZin-3 geladene Inselzellen reagierten auch in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Verapamil auf die unabhängig von Zugabe von 10  $\mu$ M Zink zur Perfusionslösung mit einem leichten Anstieg der FluoZin-3 Fluoreszenz (Abbildung 5-1e, f). Dieser blieb aus, wenn der Lösung kein Zink zugegeben wurde. Der konstitutive Zinkeinstrom in pankreatische Inselzellen war demnach Verapamil-sensitiven spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Auf die Depolarisation mit einer 40-mM-kaliumhaltigen Lösung reagierten die Inselzellen auch in Anwesenheit

### *Pregnenolonsulfat verstärkt die Zinkaufnahme von pankreatischen $\beta$ -Zellen*

von 10  $\mu$ M Zink nur mit einem sehr kleinen Anstieg der FluoZin3 Fluoreszenz. Dies zeigte, dass 10  $\mu$ M Verapamil die spannungsabhängigen Kalziumkanäle der Zellen annähernd vollständig inhibierte, wie wir es bereits zuvor beobachten konnten (siehe Abbildung 5-1a). Wurde dagegen der Perfusionslösung, die 10  $\mu$ M Verapamil enthielt, 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat zugesetzt, so führte dies zu einem starken Anstieg der FluoZin-3 Fluoreszenz. Dieser blieb aus, wenn der Lösung kein Pregnenolonsulfat zugegeben wurde oder war deutlich kleiner, wenn trotz Applikation von Pregnenolonsulfat sich kein Zink in der Perfusionslösung befand. Folglich führte Pregnenolonsulfat zu einem Zinkeinstrom in pankreatische Inselzellen von Mäusen, der zum Teil unabhängig von Verapamilsensitiven spannungsabhängigen Kalziumkanälen war.

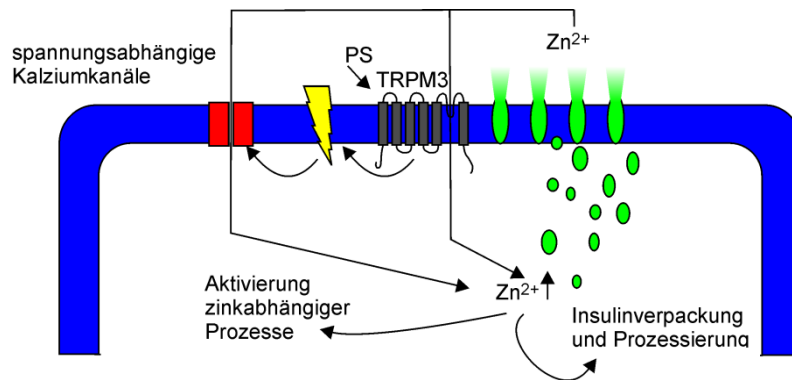
## **5.4 Diskussion**

In der  $\beta$ -Zelle besitzt Zink eine wichtige Rolle bei der Regulation diverser Enzyme und der korrekten Prozessierung und Verpackung von Insulin. Diabetes beeinflusst die Zinkhomöostase des Körpers in vielerlei Hinsicht. So ist die erhöhte Ausscheidung von Zink über den Urin und die erniedrigte Zinkkonzentration im Körper von Diabetikern höchstwahrscheinlich auf die Hyperglykämie zurückzuführen, wobei die Hyperglykämie die renale Zinkwiederaufnahme hemmen soll [148]. So führt bei Hunden eine experimentell eingeleitete Hyperglykämie zu einer Hyperzinkurie [149], und auch bei Ratten, die durch die Gabe von Streptozotocin Diabetes entwickeln, kann eine vermehrte Ausscheidung von Zink beobachtet werden [149]. Auf der anderen Seite gibt es auch Hinweise, dass Zinkmangel selbst eine Ursache von Diabetes sein kann. Bei Ratten führt eine zinkarme Diät zu einer verminderten Insulinsekretion nach Glukosegabe [150]. Eine verminderte Zinkaufnahme der  $\beta$ -Zelle, welche die Fähigkeit der Zelle zur Bildung, Prozessierung und Verpackung von Insulin beeinträchtigt, könnte somit speziell zur Entwicklung von Typ II Diabetes beitragen.

Zinkabhängige antioxidative Enzyme schützen die Zelle vor freien Radikalen und intrazellulären Oxidantien [148]. Zinkmangel könnte daher zur vermehrten Apoptose von  $\beta$ -Zellen aufgrund von oxidativem Stress führen und somit zu einer verminderten Insulinsekretion, was schließlich Diabetes auslösen kann. Diese Punkte machen deutlich, wie wichtig die Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase der  $\beta$ -Zelle für den Körper ist. Trotzdem ist bisher nur sehr wenig über die Mechanismen, die die Zinkaufnahme der  $\beta$ -Zelle vermitteln, bekannt. Während Zinktransporter, die Zink aktiv in die Zelle befördern, bisher in der  $\beta$ -Zelle nur auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden konnten, wurde funktionell gezeigt, dass Zink über Ionenkanäle aufgenommen werden kann. Bisher wurde dies bei pankreatischen Inseln aber nur für spannungsabhängige Kalziumkanäle gezeigt.

In diesem Kapitel zeigen wir, dass Pregnenolonsulfat die Zinkaufnahme von Inselzellen unabhängig von Verapamil-sensitiven Kanälen erhöht. Wir konnten bereits in Kapitel 4 zeigen, dass TRPM3-Kanäle für den durch Pregnenolon-





**Abbildung 5-2: Modell der TRPM3-vermittelten Wiederaufnahme von Zink pankreatischer  $\beta$ -Zellen.**

Zink, welches mit Insulin sekretiert wurde, kann durch konstitutiv aktive TRPM3-Kanäle wieder in die Zelle gelangen. Dieser Mechanismus kann durch die Aktivierung von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat (PS) verstärkt werden. Durch die Aktivierung von TRPM3 können auch über die Depolarisation aktivierte spannungsabhängige Kalziumkanäle die Zinkaufnahme verstärken.

---

sulfat ausgelösten Kalziumeinstrom der  $\beta$ -Zellen verantwortlich sind. Es ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass der durch Pregnenolonsulfat ausgelöste Zinkeinstrom pankreatischer Inselzellen ebenfalls durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen in den  $\beta$ -Zellen zustande kam. Mit Pregnenolonsulfat aktivierbare TRPM3-Kanäle bilden somit einen regulierten Weg der Zinkaufnahme von pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Abbildung 5-2 zeigt basierend auf unseren Ergebnissen, wie TRPM3-Kanäle die Zinkhomöostase der  $\beta$ -Zelle beeinflussen könnten.

Säugetiere sind in der Lage, Pregnenolonsulfat selbst zu bilden. Inwiefern TRPM3-Kanäle im Körper durch Pregnenolonsulfat reguliert werden und dadurch zur Zinkaufnahme von pankreatischen Inselzellen beitragen, ist jedoch ungewiss. Die hier verwendete Konzentration von 50  $\mu$ M Pregnenolonsulfat übersteigt die bisher bei Säugern gemessenen Plasmakonzentrationen von Pregnenolonsulfat um das Zehn- bis Hundertfache. Wir konnten aber bereits zeigen, dass endogene TRPM3-Kanäle pankreatischer  $\beta$ -Zellen bereits durch 5  $\mu$ M Pregnenolonsulfat aktiviert werden (Kapitel 4), eine Konzentration, die bereits im Plasma von Müttern nach einer Geburt nachgewiesen wurde. Somit scheint die Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch Pregnenolonsulfat zur Zinkaufnahme zumindest unter bestimmten Bedingungen denkbar. In diesem Zu-

sammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob bei Schwangeren, der aufgrund der größeren  $\beta$ -Zellmasse erhöhte Zinkbedarf, über die Aktivierung von TRPM3-Kanälen und die daraus resultierende Zinkaufnahme ausgeglichen wird.

Auf der anderen Seite ist es jedoch nicht auszuschließen, dass eine bisher nicht identifizierte, endogen gebildete Substanz, und nicht Pregnenolonsulfat, TRPM3-Kanäle aktiviert und somit die Zinkaufnahme von pankreatischen Inselzellen reguliert. Mit TRPM3 transfizierte HEK293 Zellen weisen im Vergleich zu nicht transfizierten HEK293 Zellen eine erhöhte Basiskonzentration von Kalzium auf. Dies ist auf konstitutiv aktive TRPM3-Kanäle zurückzuführen [21]. Unsere Ergebnisse und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [25] zeigen, dass Zink konstitutiv von pankreatischen Zellen aufgenommen wird, und dass dieser Prozess unabhängig von Verapamil-sensitiven, spannungsabhängigen Kalziumkanälen ist. TRPM3-Kanäle könnten daher für die konstitutive Zinkaufnahme von  $\beta$ -Zellen verantwortlich sein. Dies deutet an, dass TRPM3-Kanäle auch unabhängig von der Aktivierung durch Pregnenolonsulfat eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase von pankreatischen Inselzellen spielen könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 11-21.
2. Clapham DE. (2007) Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-58.
3. Ashcroft FM. (2006) From molecule to malady. *Nature*, 440, 440-7.
4. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 5, 993-6.
5. Landry Y, Gies JP. (2008) Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam Clin Pharmacol*, 22, 1-18.
6. Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-24.
7. Clapham DE. (2007) SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell*, 129, 220.
8. Montell C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2001, RE1.
9. Erler I, Al-Ansary DM, Wissenbach U, Wagner TF, Flockerzi V, Niemeyer BA. (2006) Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem*, 281, 38396-404.
10. Fujiwara Y, Minor DL, Jr. (2008) X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol*, 383, 854-70.
11. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 685-717.
12. Voets T, Nilius B. (2003) The pore of TRP channels: trivial or neglected? *Cell Calcium*, 33, 299-302.
13. Vriens J, Nilius B, Vennekens R. (2008) Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels *Curr Neuropharmacol*, 6, 76-96.
14. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416, 52-8.

15. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit K, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, 306-13.
16. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*, 418, 186-90.
17. Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Levesque PC, Blannar MA. (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem*, 278, 20890-7.
18. Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem*, 278, 21493-501.
19. Grimm C, Kraft R, Schultz G, Harteneck C. (2005) Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]. *Mol Pharmacol*, 67, 798-805.
20. Millar ID, Bruce J, Brown PD. (2007) Ion channel diversity, channel expression and function in the choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Res*, 4, 8.
21. Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE. (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem*, 280, 22540-8.
22. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S. (2006) Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res*, 26, 159-78.
23. Appendino G, Minassi A, Pagani A, Ech-Chahad A. (2008) The role of natural products in the ligand deorphanization of TRP channels. *Curr Pharm Des*, 14, 2-17.

24. Calixto JB, Kassuya CA, Andre E, Ferreira J. (2005) Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther*, 106, 179-208.
25. Gyulkhandanyan AV, Lee SC, Bikopoulos G, Dai F, Wheeler MB. (2006) The Zn<sup>2+</sup>-transporting pathways in pancreatic beta-cells: a role for the L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem*, 281, 9361-72.
26. Loch S. (2007) Elektrophysiologische Charakterisierung von TRPM3 Ionenkanälen. In: Fachrichtung 2.4 - Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
27. Mayo W, Le Moal M, Abrous DN. (2001) Pregnenolone sulfate and aging of cognitive functions: behavioral, neurochemical, and morphological investigations. *Horm Behav*, 40, 215-7.
28. Schumacher M, Liere P, Akwa Y, Rajkowski K, Griffiths W, Bodin K, Sjoval J, Baulieu EE. (2008) Pregnenolone sulfate in the brain: a controversial neurosteroid. *Neurochem Int*, 52, 522-40.
29. Montell C. (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005, re3.
30. Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ. (2005) Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol*, 145, 405-14.
31. Beato M, Sanchez-Pacheco A. (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev*, 17, 587-609.
32. Lösel R, Wehling M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 46-56.
33. Yaghoubi N, Malayev A, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH. (1998) Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res*, 803, 153-60.
34. Majewska MD, Mienville JM, Vicini S. (1988) Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett*, 90, 279-84.

35. Wang Q, Wang L, Wardwell-Swanson J. (1998) Modulation of cloned human neuronal voltage-gated potassium channels (hKv1.1 and hKv2.1) by neurosteroids. *Pflugers Arch*, 437, 49-55.
36. Sabeti J, Nelson TE, Purdy RH, Gruol DL. (2007) Steroid pregnenolone sulfate enhances NMDA-receptor-independent long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses: role for L-type calcium channels and sigma-receptors. *Hippocampus*, 17, 349-69.
37. Hige T, Fujiyoshi Y, Takahashi T. (2006) Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats. *Eur J Neurosci*, 24, 1955-66.
38. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
39. Bödding M, Wissenbach U, Flockerzi V. (2002) The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca<sup>2+</sup> sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem*, 277, 36656-64.
40. Wissenbach U, Bodding M, Freichel M, Flockerzi V. (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett*, 485, 127-34.
41. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. (2002) Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*, 277, 23150-6.
42. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-50.
43. Nilsson KR, Zorumski CF, Covey DF. (1998) Neurosteroid analogues. 6. The synthesis and GABA<sub>A</sub> receptor pharmacology of enantiomers of dehydroepiandrosterone sulfate, pregnenolone sulfate, and (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ )-3-hydroxypregnan-20-one sulfate. *J Med Chem*, 41, 2604-13.
44. Neher E, Sakmann B. (1992) The patch clamp technique. *Sci Am*, 266, 44-51.

45. Oberwinkler J. (2007) TRPM3, a biophysical enigma? *Biochem Soc Trans*, 35, 89-90.
46. Wagner TF. (2004) Diplomarbeit: Pharmakologische Charakterisierung TRPM3 kodierter Ionenkanäle. In: Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikology. Universität des Saarlandes, Homburg.
47. Hertz L. (2006) Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int*, 48, 416-25.
48. Hyman SE. (2005) Neurotransmitters. *Curr Biol*, 15, R154-8.
49. Pertwee RG. (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 1-51.
50. Baulieu EE. (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 963-87.
51. Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. (1995) Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52, 113-33.
52. Plant TD, Schaefer M. (2005) Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 371, 266-76.
53. Kawabe Y, Nakamura H, Hino E, Suzuki S. (2008) Photochemical stabilities of some dihydropyridine calcium-channel blockers in powdered pharmaceutical tablets. *J Pharm Biomed Anal*, 47, 618-24.
54. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B. (2002) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*, 277, 13569-77.
55. Dharmasathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H. (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol*, 246, G204-8.
56. Irnaten M, Blanchard-Gutton N, Harvey BJ. (2008) Rapid effects of 17beta-estradiol on epithelial TRPV6 Ca<sup>2+</sup> channel in human T84 colonic cells. *Cell Calcium*, 44, 441-52.

57. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem*, 276, 19461-8.
58. Mennerick S, Lamberta M, Shu HJ, Hogins J, Wang C, Covey DF, Eisenman LN, Zorumski CF. (2008) Effects on membrane capacitance of steroids with antagonist properties at GABAA receptors. *Biophys J*, 95, 176-85.
59. Venkatachalam K, Montell C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76, 387-417.
60. Lösel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, 83, 965-1016.
61. Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Dufer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J. (2008) Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol*.
62. Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. (1998) Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part I. *Clin Pharmacokinet*, 34, 457-82.
63. Marin TZ, Meier R, Kraehenmann F, Burkhardt T, Zimmermann R. (2007) Nifedipine serum levels in pregnant women undergoing tocolysis with nifedipine. *J Obstet Gynaecol*, 27, 260-3.
64. Papatsonis DN, Bos JM, van Geijn HP, Lok CA, Dekker GA. (2007) Nifedipine pharmacokinetics and plasma levels in the management of preterm labor. *Am J Ther*, 14, 346-50.
65. Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. (2008) TRPA1 channels: Novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)*, 2.
66. Peterlin Z, Chesler A, Firestein S. (2007) A painful trp can be a bonding experience. *Neuron*, 53, 635-8.
67. Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. (2008) TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J Neurosci*, 28, 7863-75.



68. Chen SC, Wu FS. (2004) Mechanism underlying inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by pregnenolone sulfate in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, 1027, 196-200.
69. Cheung CC, Lustig RH. (2007) Pituitary development and physiology. *Pituitary*, 10, 335-50.
70. Büküşoğlu C, Sarlak F. (1996) Pregnenolone sulfate increases intracellular  $Ca^{2+}$  levels in a pituitary cell line. *Eur J Pharmacol*, 298, 79-85.
71. Klinker R, Silbernagl S. (2005) Physiology.
72. Gimpl G, Fahrenholz F. (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81, 629-83.
73. Greenspan FS, Gardner DG. (2004) Basic & Clinical Endocrinology.
74. Tashjian AH, Jr., Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML. (1968) Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology*, 82, 342-52.
75. Friend JP. (1979) Cell size and cell division of the anterior pituitary: time course in the growing rat. *Experientia*, 35, 1577-8.
76. Mannebach S. (2008) Dissertation: Untersuchung von TRPM3-Kationenkanälen mit Hilfe von Knock-down- und Knock-out-Methoden. In: Fachrichtung 2.4 - Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
77. Mastorakos G, Ilias I. (2003) Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci*, 997, 136-49.
78. Coulter CL, Jaffe RB. (1998) Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology*, 139, 5144-50.
79. Lockwood CJ, Radunovic N, Nastic D, Petkovic S, Aigner S, Berkowitz GS. (1996) Corticotropin-releasing hormone and related pituitary-adrenal axis hormones in fetal and maternal blood during the second half of pregnancy. *J Perinat Med*, 24, 243-51.

80. de Peretti E, Mappus E. (1983) Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, 57, 550-6.
81. Lanthier A, Patwardhan VV. (1986) Sex steroids and 5-en-3 beta-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *J Steroid Biochem*, 25, 445-9.
82. Havlikova H, Hill M, Hampl R, Starka L. (2002) Sex- and age-related changes in epitestosterone in relation to pregnenolone sulfate and testosterone in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2225-31.
83. Chang RJ, Buster JE, Blakely JL, Okada DM, Hobel CJ, Abraham GE, Marshall JR. (1976) Simultaneous comparison of delta 5-3beta-hydroxysteroid levels in the fetoplacental circulation of normal pregnancy in labor and not in labor. *J Clin Endocrinol Metab*, 42, 744-51.
84. Kojima S, Yanaihara T, Nakayama T. (1981) Serum steroid levels in children at birth and in early neonatal period. *Am J Obstet Gynecol*, 140, 961-5.
85. Laatikainen T, Peltonen J. (1975) Foetal and maternal plasma levels of steroid sulphates in human pregnancy at term. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 79, 577-88.
86. Hill M, Parizek A, Klak J, Hampl R, Sulcova J, Havlikova H, Lapcik O, Bicikova M, Fait T, Kancheva R, Cibula D, Pouzar V, Meloun M, Starka L. (2002) Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 3.3beta-hydroxy-5-ene steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82, 241-50.
87. Grondal S, Curstedt T. (1991) Steroid profile in serum: increased levels of sulphated pregnenolone and pregn-5-ene-3 beta,20 alpha-diol in patients with adrenocortical carcinoma. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 124, 381-5.
88. Hirato K, Yanaihara T. (1990) Serum steroid hormone levels in neonates born from the mother with placental sulfatase deficiency. *Endocrinol Jpn*, 37, 731-9.
89. Pickup JC, Williams G. (2002) *Textbook of Diabetes*.

90. Cherrington AD, Moore MC, Sindelar DK, Edgerton DS. (2007) Insulin action on the liver in vivo. *Biochem Soc Trans*, 35, 1171-4.
91. Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C. (1999) Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 892, 119-26.
92. Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P, Ashcroft FM. (2009) Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 257-67.
93. Ashcroft FM, Rorsman P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol*, 54, 87-143.
94. Henquin JC. (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49, 1751-60.
95. Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML, Malaisse WJ. (2002) Pancreatic and extrapancreatic effects of GLP-1. *Diabetes Metab*, 28, 3S85-9; discussion 3S108-12.
96. Gautam D, Jeon J, Li JH, Han SJ, Hamdan FF, Cui Y, Lu H, Deng C, Gavrilova O, Wess J. (2008) Metabolic roles of the M3 muscarinic acetylcholine receptor studied with M3 receptor mutant mice: a review. *J Recept Signal Transduct Res*, 28, 93-108.
97. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanauskaite J, Partridge C, Johnson PR, Rorsman P. (2008) Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes*, 57, 1618-28.
98. Roe MW, Worley JF, 3rd, Qian F, Tamarina N, Mittal AA, Dralyuk F, Blair NT, Mertz RJ, Philipson LH, Dukes ID. (1998) Characterization of a Ca<sup>2+</sup>-release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in transgenically derived beta-cells. *J Biol Chem*, 273, 10402-10.
99. Sakura H, Ashcroft FM. (1997) Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia*, 40, 528-32.

100. Mears D, Zimlik CL. (2004) Muscarinic agonists activate  $\text{Ca}^{2+}$  store-operated and -independent ionic currents in insulin-secreting HIT-T15 cells and mouse pancreatic beta-cells. *J Membr Biol*, 197, 59-70.
101. Janssen SW, Hoenderop JG, Hermus AR, Sweep FC, Martens GJ, Bindels RJ. (2002) Expression of the novel epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel ECaC1 in rat pancreatic islets. *J Histochem Cytochem*, 50, 789-98.
102. Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, Hibi T. (2004) Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 219-25.
103. Gram DX, Ahren B, Nagy I, Olsen UB, Brand CL, Sundler F, Tabanera R, Svendsen O, Carr RD, Santha P, Wierup N, Hansen AJ. (2007) Capsaicin-sensitive sensory fibers in the islets of Langerhans contribute to defective insulin secretion in Zucker diabetic rat, an animal model for some aspects of human type 2 diabetes. *Eur J Neurosci*, 25, 213-23.
104. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-24.
105. Karlsson S, Scheurink AJ, Steffens AB, Ahren B. (1994) Involvement of capsaicin-sensitive nerves in regulation of insulin secretion and glucose tolerance in conscious mice. *Am J Physiol*, 267, R1071-7.
106. Cheng H, Beck A, Launay P, Gross SA, Stokes AJ, Kinet JP, Fleig A, Penner R. (2007) TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium*, 41, 51-61.
107. Marigo V, Courville K, Hsu WH, Feng JM, Cheng H. (2009) TRPM4 impacts on  $\text{Ca}^{2+}$  signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol*, 299, 194-203.
108. Prawitt D, Monteilh-Zoller MK, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, Penner R. (2003) TRPM5 is a transient  $\text{Ca}^{2+}$ -activated cation channel responding to rapid changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15166-71.

109. Liman ER. (2007) TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol*, 287-98.
110. Vennekens R, Nilius B. (2007) Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb Exp Pharmacol*, 269-85.
111. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130, 167-78.
112. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, 38, 3751-7.
113. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 71, 741-7.
114. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K. (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*, 127, 126-32.
115. Klee WA, Nirenberg M. (1974) A neuroblastoma X glioma hybrid cell line with morphine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 3474-7.
116. Isaacs JT, Hukku B. (1988) Nonrandom involvement of chromosome 4 in the progression of rat prostatic cancer. *Prostate*, 13, 165-88.
117. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. (1996) ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*, 62, 155-69.
118. Schulla V, Renstrom E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermuller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P, Hofmann F. (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice. *Embo J*, 22, 3844-54.
119. Gilon P, Henquin JC. (1992) Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem*, 267, 20713-20.

120. Mears D. (2004) Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Membr Biol*, 200, 57-66.
121. Freeze BS, McNulty MM, Hanck DA. (2006) State-dependent verapamil block of the cloned human  $\text{Ca}_v3.1$  T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Mol Pharmacol*, 70, 718-26.
122. Cai D, Mülle JG, Yue DT. (1997) Inhibition of recombinant  $\text{Ca}^{2+}$  channels by benzothiazepines and phenylalkylamines: class-specific pharmacology and underlying molecular determinants. *Mol Pharmacol*, 51, 872-81.
123. Hargreaves AC, Gunthorpe MJ, Taylor CW, Lummis SC. (1996) Direct inhibition of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors by antagonists of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Mol Pharmacol*, 50, 1284-94.
124. Rybalchenko V, Prevarskaya N, Van Coppenolle F, Legrand G, Lemonnier L, Le Bourhis X, Skryma R. (2001) Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing  $\text{K}^{+}$  channel gating. *Mol Pharmacol*, 59, 1376-87.
125. Catterall WA, Few AP. (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59, 882-901.
126. Jacobson DA, Philipson LH. (2007) TRP channels of the pancreatic beta cell. *Handb Exp Pharmacol*, 409-24.
127. Heit JJ, Karnik SK, Kim SK. (2006) Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 311-38.
128. Dunn MF. (2005) Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals*, 18, 295-303.
129. Hutton JC, Penn EJ, Peshavaria M. (1983) Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secreting granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J*, 210, 297-305.
130. de Peretti E, Forest MG, Loras B, Morel Y, David M, Francois R, Bertrand J. (1986) Usefulness of plasma pregnenolone sulfate in testing pituitary-adrenal function in children. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 279, 259-63.

131. Bicikova M, Tallova J, Hill M, Krausova Z, Hampl R. (2000) Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochem Res*, 25, 1623-7.
132. Tagawa N, Tamanaka J, Fujinami A, Kobayashi Y, Takano T, Fukata S, Kuma K, Tada H, Amino N. (2000) Serum dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and pregnenolone sulfate concentrations in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *Clin Chem*, 46, 523-8.
133. Charmandari E, Weise M, Bornstein SR, Eisenhofer G, Keil MF, Chrousos GP, Merke DP. (2002) Children with classic congenital adrenal hyperplasia have elevated serum leptin concentrations and insulin resistance: potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2114-20.
134. Speiser PW, Serrat J, New MI, Gertner JM. (1992) Insulin insensitivity in adrenal hyperplasia due to nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 1421-4.
135. Vallee M, George O, Vitiello S, Le Moal M, Mayo W. (2004) New insights into the role of neuroactive steroids in cognitive aging. *Exp Gerontol*, 39, 1695-704.
136. Vallee M, Mayo W, Le Moal M. (2001) Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Res Brain Res Rev*, 37, 301-12.
137. Gee KR, Zhou ZL, Qian WJ, Kennedy R. (2002) Detection and imaging of zinc secretion from pancreatic beta-cells using a new fluorescent zinc indicator. *J Am Chem Soc*, 124, 776-8.
138. Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH, Ward AD, Lincoln SF, Mahadevan I. (1994) Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J Histochem Cytochem*, 42, 877-84.
139. Gee KR, Zhou ZL, Ton-That D, Sensi SL, Weiss JH. (2002) Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*, 31, 245-51.

140. Zhao J, Bertoglio BA, Gee KR, Kay AR. (2008) The zinc indicator Fluo-Zin-3 is not perturbed significantly by physiological levels of calcium or magnesium. *Cell Calcium*, 44, 422-6.
141. Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. (2006) Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol*, 80, 1-9.
142. Hamer DH. (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem*, 55, 913-51.
143. Palmiter RD, Huang L. (2004) Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch*, 447, 744-51.
144. Liuzzi JP, Cousins RJ. (2004) Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr*, 24, 151-72.
145. Eide DJ. (2004) The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch*, 447, 796-800.
146. Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DM, Hubbard RE, Isaacs NW, Reynolds CD, et al. (1988) The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 319, 369-456.
147. Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. (2005) Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*, 54, 1808-15.
148. Chausmer AB. (1998) Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr*, 17, 109-15.
149. Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, Silvis SE, McClain CJ. (1983) Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J Med*, 75, 273-7.
150. Quarterman J, Mills CF, Humphries WR. (1966) The reduced secretion of, and sensitivity to insulin in zinc-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 25, 354-8.



## 7 Veröffentlichungen

1. **T. F.J. Wagner**, S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach, I. Mathar, M. Düfer, A. Lis, V. Flockerzi, S. E. Philipp and J. Oberwinkler (2008), **Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic  $\beta$  cells**, Nature Cell Biology 10, 1421 – 1430
2. I. Erler, D. M. M. Al-Ansary, U. Wissenbach, **T. F. J. Wagner**, V. Flockerzi, and B. A. Niemeyer (2006), **Trafficking and Assembly of the Cold-sensitive TRPM8 Channel**, Journal of Biological Chemistry 281(50): 38396 – 404
3. **Wagner TFJ**, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S, Oberwinkler J (2009) **TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic  $\beta$  cells**. In preparation\*.
4. Lambert S, Drews A, **Wagner TFJ**, Loch S, Lis A, Philipp SE, Oberwinkler J (2009) **TRPM1 is a functional ion-conducting protein and forms heteromultimers with TRPM3**. In preparation\*.
5. **Wagner TFJ**, Lambert S, Mannebach S, Philipp SE, Oberwinkler J (2009) **Identification and functional characterization of the ionotropic steroid receptor TRPM3 in cells of the anterior mouse pituitary**. In preparation\*

\* Angaben zu Titel, Autoren und Jahr der Veröffentlichung sind vorläufig.

## 8 Danksagung

Ich werde mich stets gerne an meine Zeit als Doktorand zurückerinnern. Dies ist an erster Stelle der Verdienst meines Doktorvaters Dr. Johannes Oberwinkler, bei dem ich mich für die exzellente Betreuung, die Unterstützung und Begleitung dieser Arbeit bedanken möchte. Dank ihm konnte ich mich mit einem Thema befassen, das mich von Anfang an begeistert hat. Ohne seine scheinbar unerschöpflichen Ideen und die motivierende Art und Weise mit der er mich während der gesamten Zeit unterstützt hat, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Durch unsere Zusammenarbeit habe ich gelernt eigene wissenschaftliche Ideen zu generieren und umzusetzen.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Veit Flockerzi, der mich während meiner Promotion immer unterstützt hat. Vielen Dank auch an PD Dr. Stephan Philipp, Stefanie Mannebach und Prof. Dr. Marc Freichel für die gute Kooperation in den einzelnen Projekten und für das zur Verfügung stellen der TRPM3<sup>-/-</sup> Mäuse.

Ich danke Professor, Dr. med. Franz Hofmann für das freundliche zur Verfügung stellen der  $\beta$ -Zell-spezifischen Cav1.2<sup>-/-</sup> Mäuse.

Ich danke Sachar Lambert, Dr. Sabine Loch, Isabelle Straub, Florian Mohr, Anna Drews, Oleksandr Rizun, Katja Kraushaar, Melanie Portz und Sandra Plant für die angenehme Zeit in der Arbeitsgruppe und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke weiterhin Heidi Löhr, Inge Vehar und Christa Seelinger für die exzellente Unterstützung.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Freunde und Kollegen Ilka Mathar, Stefan Groß und Ulrich Kriebs richten, deren voller Unterstützung ich mir immer gewiss sein konnte.

Ich möchte meinen Eltern, Marianne und Horst, und meinem Geschwistern Anke, Christian und Stephan ein riesengroßes Dankeschön aussprechen, da sie mich stets tatkräftig unterstützt haben. Danke!

Ich danke herzlich meiner Freundin Judith für die Unterstützung und all das wofür hier viel zu wenig Platz ist. Du bist die Beste!

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Thomas Friedrich Johannes Wagner  
Geburtstag: 21. Februar 1978 in Saarbrücken  
Nationalität: deutsch

### Wissenschaftlicher Werdegang:

10/1998 – 09/2000	Studium der Werkstoffwissenschaften Universität des Saarlandes
10/2000 – 09/2002	Grundstudium Biologie Philipps Universität Marburg
10/2002 – 10/2005	Hauptstudium Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie Universität des Saarlandes
01/2005 – 09/2005	Diplomarbeit bei Dr. Johannes Oberwinkler Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universität des Saarlandes